

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLON KANSERİ HÜCRELERİNİN
MEZENKİMAL-EPİTEL DÖNÜŞÜMÜ
SÜRECİNDE EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN
ARAŞTIRILMASI

Zeynep Aleyna ŞAHİN

Haziran, 2022
İZMİR

**KOLON KANSERİ HÜCRELERİNİN
MEZENKİMAL-EPİTEL DÖNÜŞÜMÜ
SÜRECİNDE EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Zeynep Aleyna ŞAHİN

Haziran, 2022

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

ZEYNEP ALEYNA ŞAHİN, tarafından **PROF. DR. ÇETİN ILGAZ** ve **DR. ÖĞR. ÜYESİ ASLI SADE MEMİŞOĞLU** yönetiminde hazırlanan “**KOLON KANSERİ HÜCRELERİNİN MEZENKİMAL-EPİTEL DÖNÜŞÜMÜ SÜRECİNDE EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Çetin ILGAZ

Dr. Öğr. Üyesi Aslı SADE MEMİŞOĞLU

Yönetici

Yönetici

Dr. Öğr. Üyesi Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

Doç. Dr. Kerem CANLI

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KOÇAK SEZGİN

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Okan FISTIKOĞLU

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Öncelikle bize bu çalışma fırsatını ve hayallerimi gerçekleştirme şansını verdiği için danışman hocam Prof. Dr. Çetin ILGAZ'a çok teşekkür ederim. Bir diğer özel teşekkürüm ise hem 2. tez danışmanım hem de bu süreçte her an yanımda olan çok sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı Sade MEMİŞOĞLU'nadır. Kendisiyle çalıştığım için çok şanslıyım.

Beni bütün eğitim hayatım boyunca destekleyen ve bu yaşa kadar her an elimden tutan, yanımda olan başta annem Neşe CEYLAN olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Beni bu yaşa getiren, bakan, büyütün canım anneannem Ayşe CEYLAN ve canım dedem Salim CEYLAN'a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte beni bir an bile yalnız bırakmayan her sorumda ve sorunumda yanımda olan çok değerli Dr. Zehra TAVŞAN'a çok teşekkür ederim. O olmasaydı her şey çok zor olurdu. Laboratuvar hakkındaki bütün bilgilerini ve notlarını benimle paylaşan canım arkadaşım Nazlı Şevval MENEMENLİ'ye çok teşekkür ederim.

Her koşulda nолursa olsun yanımda olan, pes ettiğim anlarda beni yeniden güçlendiren canım arkadaşlarım Özlem KAYA, Sevinç KAYA ve Merve COŞKUN'a çok teşekkür ederim. İyi ki varlar.

Bir diğer önemli teşekkürüm ise uykusuz gecelerin sabahında yanı başımda olan canım kahveye tabi ki.

Ve sanırım en büyük teşekkürü kendime ediyorum. İnandığım, yılmadığım ve bütün zorluklara rağmen devam ettiğim için kendime çok ama çok teşekkür ederim.

Bu alışma Dokuz Eylöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından 2021.KB.FEN.021 nolu “Kolon kanseri hücrelerinin mezenkimal-epitel dönüşümü sürecinde epigenetik değişimlerin araştırılması” isimli BAP projesi ile desteklenmiştir.

Zeynep Aleyna ŞAHİN



KOLON KANSERİ HÜCRELERİNİN MEZENKİMAL-EPİTEL DÖNÜŞÜMÜ SÜRECİNDE EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI

ÖZ

Kolorektal kanser (KRK), tüm dünyada en yaygın kötü huylu tümörlerden biridir. KRK genel anlamda tedavisi olan bir kanser türüdür ancak kanserin metastaz yapması hastalığın seyrini kötü etkilemektedir. Kanser metastazı ile bağlantılı olan önemli bir biyolojik süreç epitel mezenkimal dönüşümdür (EMT). Bu sebeple EMT-MET sürecini aydınlatmak kanser ölümlerinin en önemli sebebi olan metastazın aydınlatılması için önemli bir adımdır. Pek çok kanıt, normal hücreler ve tümör hücrelerinde EMT'nin DNA dizisindeki değişimler sonucu değil, epigenetik bir süreç olarak düzenlendiğini göstermektedir.

Bu çalışmada bir kolon kanseri hücre hattı HT-29 kullanılarak kendiliğinden MET ve EMT geçirebilen yeni bir model oluşturulmuştur. HT-29 MET-EMT hücre modelinde üç tip alt popülasyon, atasal, epitel ve mezenkimal, elde edilmiş ve bu alt popülasyonlar epitel mezenkimal belirteçler, histon modifikasyonları, epigenetik düzenleyiciler, ilaç direnci ve hücre çoğalması açısından karakterize edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda epitel belirteçlerin epitel hücrelerde, mezenkimal belirteçlerin ise mezenkimal ve atasal hücrelerde arttığı gözlenmiştir. Oluşturulan MET-EMT modelinde epitel hücrelerde baskılayıcı histon işareti artarken tetikleyici histon işareti azalmaktadır. Yine epitel hücrelerde EZH1, CBX-4, CBX-7 miktarları artarken, CBX-8 ve EZH2 miktarları ise azalmıştır. MET-EMT modelinde 5-fluorourasil ve oxaliplatin için istatistiksel olarak anlamlı değilse de mezenkimal hücrelerde daha yüksek direnç gözlenmiştir. Hücre canlılığı ise atasal ve mezenkimal grupta epitel gruba göre çok daha yüksek çıkmıştır. Çalışma, kolon kanserinde ve MET-EMT sürecinde epigenetik mekanizmaların aydınlatılması ve yeni tedavi hedeflerinin tespit edilmesi yolunda önemli bir adımı oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: Epigenetik, epitel-mezenkimal dönüşüm, ilaç direnci, kolon kanseri, polycomb proteinleri



INVESTIGATION OF THE EPIGENETIC CHANGES DURING EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION OF COLON CANCER CELLS

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors worldwide. CRC is a type of cancer that is generally curable, but metastasis of the cancer adversely affects the course of the disease. An important biological process associated with cancer metastasis is epithelial mesenchymal transition (EMT). For this reason, elucidating the EMT-MET process is an important step towards elucidating metastasis, which is the most important cause of cancer deaths. Much evidence indicates that EMT in normal cells and tumor cells is regulated as an epigenetic process, not as a result of changes in DNA sequence.

In this study, a new model that can spontaneously undergo MET and EMT was created using a colon cancer cell line HT-29. Three types of subpopulations, ancestral, epithelial, and mesenchymal, were obtained in the HT-29 MET-EMT cell model, and these subpopulations were characterized for epithelial mesenchymal markers, histone modifications, epigenetic regulators, drug resistance, and cell proliferation.

It was observed that epithelial markers increased in epithelial cells and mesenchymal markers increased in mesenchymal and ancestral cells. In this MET-EMT model, while the suppressor histone sign increases in epithelial cells, the activating histone sign decreases. In addition, the protein amounts of EZH1, CBX-4, and CBX-7 has increased in epithelial cells, while the amounts of CBX-8 and EZH2 has decreased. For 5-fluorouracil and oxaliplatin in the MET-EMT model, higher resistance was observed in mesenchymal cells, although not statistically significant. Cell viability was much higher in the ancestral and mesenchymal groups than in the epithelial group. The study constitutes an important step towards elucidating the

epigenetic mechanisms and identifying new treatment targets in colon cancer and the MET-EMT process.

Keywords: Epigenetic, epithelial-mesenchymal transition, drug resistance, colon cancer, polycomb protein



İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ	v
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xiii

BÖLÜM BİR - GİRİŞ..... 1

1.1 Bağırsak Yapısı ve Farklılaşması	1
1.2 Kolorektal Kanser.....	3
1.3 Epitel-Mezenkimal Dönüşüm (EMT)	8
1.3.1 Kolon Kanserinde EMT.....	13
1.4 Epigenetik Düzenlenme	14
1.4.1 DNA Metilasyonları	15
1.4.2 Histon Metilasyonu ve Polycomb Proteinleri.....	17
1.5 EMT Modelleri.....	21
1.5.1 HT-29 Hücre Hattı.....	23

BÖLÜM İKİ - MATERYAL ve YÖNTEM..... 24

2.1 Hücre Kültürü.....	24
2.2 Protein İzolasyonu ve Protein Miktarının Ölçümü	25
2.3 Western Blot.....	25
2.4 EMT Belirteçleri ile Karakterizasyon	26
2.5 MET-EMT Sürecinde Polycomb Proteinlerinin Değişimi.....	26
2.6 Hücre Çoğalmasının Ölçümü	26

2.7 Hücre Canlılık Testi	26
2.8 İstatistiksel Analizler	27
BÖLÜM ÜÇ- BULGULAR.....	28
3.1 Farklılaşan ve Geri Farklılaşan HT-29 Hücrelerinde Morfolojik Özellikler ..	28
3.2 HT-29 MET-EMT Modeli Optimizasyonu	30
3.3 HT-29 MET-EMT Modelinde Epitel ve Mezenkimal Belirteçler.....	33
3.4 HT-29 MET-EMT Modelinde Histon Modifikasyonları ve Polycomb Üye Proteinlerindeki Değişimler	34
3.5 HT-29 MET-EMT Modelinde İlaç Hassasiyeti.....	36
3.6 HT-29 MET-EMT Modelinde Hücre Çoğalması.....	39
BÖLÜM DÖRT- TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Bağırsak yapısı.....	2
Şekil 1.2 Türkiye’de 2020 yılı yeni vaka sayısı, her iki cinsiyet, her yaştan.....	5
Şekil 1.3 Kolon kanseri oluşumu	7
Şekil 1.4 Farklı EMT tipleri	9
Şekil 1.5 EMT’nin kanser ilerlemesine katkısı	10
Şekil 1.6 Kanser gelişimi ve metastazda hücrelerin plastisitesini gösteren EMT ve MET	11
Şekil 1.7 Epitel-mezenkimal dönüşüm hücre belirteçleri	12
Şekil 1.8 İnsan genomunda CpG dinükleotidinin dağılımı ve normal hücreler ile tümör hücreleri arasındaki metilasyon paternlerindeki farklılıklar.....	16
Şekil 1.9 Polycomb-baskıcı kompleksler (PRC'ler) ve enzimatik aktiviteleri.....	19
Şekil 3.1 HT-29 hücrelerine ait 20X ve 40X mikroskop görüntüleri	29
Şekil 3.2 MET-EMT sürecinin optimizasyonu. Epitel (CDX-2, E-cadherin) ve mezenkimal (Transgelin) belirteçlerin Western blot görüntüleri.....	31
Şekil 3.3 Mezenkimal farklılaşma sürecinin optimizasyonu. Epitel belirteci CDX-2’nin Western blot görüntüleri	32
Şekil 3.4 Optimize örneklerin WB analizi	33
Şekil 3.5 HT-29 MET-EMT modelinde (A) epitel ve (B) mezenkimal belirteçlerin Western blot analizi	34
Şekil 3.6 HT-29 MET-EMT modelinde H3K27me3/H3K4me3 protein miktarlarının Western blot görüntüleri.....	35
Şekil 3.7 HT-29 MET-EMT modelinde Polycomb protein miktarlarının Western blot görüntüleri	36
Şekil 3.8 Atasal, epitel ve mezenkimal HT-29 hücrelerinde oxaliplatin ilaç hassasiyeti MTT sonuçları. Her bir veri noktası n=3, ortalama±SEM göstermektedir..	37
Şekil 3.9 Atasal, epitel ve mezenkimal HT-29 hücrelerinde 5-FU ilaç hassasiyeti MTT sonuçları. Her bir veri noktası n=3, ortalama±SEM göstermektedir	37
Şekil 3.10 HT-29 hücrelerinde aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerinin çoğalma hızları CellTiter Aqueous Assay Kit (Promega) kullanılarak	

hesaplanmıştır. Her veri noktası n=3, ortalama±sem. 2-way anova *
p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 39

Şekil 3.11 HT-29 hücrelerinde aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerinin çoğalma
hızlarına ait çizgi grafiği. Her veri noktası n=3, ortalama±sem 40



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1 Atasal, epitel ve mezenkimal HT-29 hücrelerinde Oxaliplatin ve 5-FU IC-50 değerleri	38



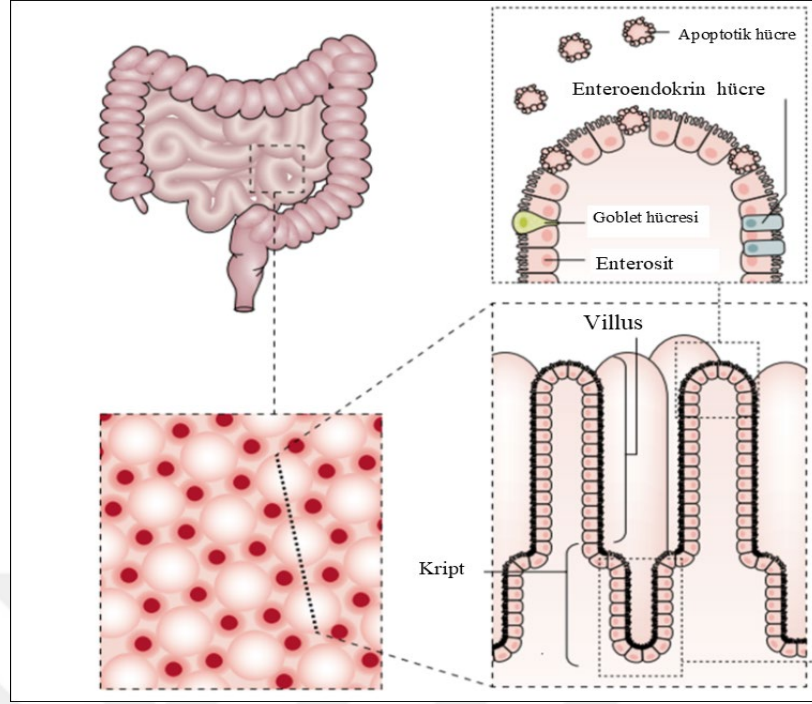
BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Bağırsak Yapısı ve Farklılaşması

Otuz m²'den büyük (Helander ve Fändriks, 2014) yüzey alanı ile insan bağırsak yolu vücudumuzdaki en büyük ikinci epitelyumu oluşturur (Gehart ve Clevers, 2019). Bağırsak epiteli milyonlarca kript-villus birimine ayrılmıştır. Bir birim, bağırsak duvarının parmak benzeri bir çıkıntısı olan bir villus ve çevresinde kript adı verilen çok sayıda girintilerden oluşur (Gehart ve Clevers, 2019).

Epitel yapı, emici (enterositler ve M hücresi) ve salgılayıcı (Paneth, goblet, enteroendokrin ve küme hücresi) soylarına ayrılan altı farklı olgun hücre tipinden oluşur. Enterositler (emici hücreler) en çok bulunan bağırsak epitel hücreleridir. Bu hücreler, apikal yüzeylerinde sıkı bağlantılarla ilişkili fırça kenar zarlarının varlığı ve sukraz izomaltaz ve alkalın fosfataz gibi fırça kenarlı hidrolazların yapıda bulunması ile karakterize edilir. Mukus üretiminden sorumlu Goblet hücreleri, bağırsak epitelinin %5'ini oluşturur. Enteroendokrin hücreler, bağırsağın küçük bir bölümünü oluşturur ve belirli hormonlar üreterek gastrointestinal (GI) motilitesinde işlev görür. Paneth hücreleri çoğunlukla antimikrobiyal savunma ile ilgilidir. Bağırsak epitel hücrelerinin konumları, kript-villus eksenini boyunca farklılaşma durumlarına göre değişkenlik gösterir; altta farklılaşmamış hücreler ve üstte kriptlerin dibinde bulunan Paneth hücreleri hariç daha farklılaşmış hücreler bulunur (Barbara, van den Brink, ve Roberts, 2003) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Bağırsak yapısı (Gehart ve Clevers, 2019)

Bağırsak farklılaşma programı, hücreler kriptten villusa göç ederken bağırsak kriptlerinin tabanı yakınında bulunan kök hücrelerin proliferasyonu ve ardından farklılaşması ile karakterize edilir (Barbara vd., 2003). Epitel tümörleri oluşturan hücreler, E-cadherin gibi epitele özgü genlerin ifadesinin kaybolduğu, çoğalma ve metastaz yapma yeteneği kazandığı farklılaşmamış bir fenotip gösterir (Johnson, 1999; Solanas vd., 2008). GI kanalın epiteli sürekli yenilenir ve kript-villus eksenı boyunca oldukça kontrollü olan farklılaşma programı, bağırsak homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar (Barbara vd., 2003). Bağırsak epitel hücrelerinin dengeli ve sürekli oluşumunun moleküler mekanizması, tam olarak anlaşılamayan bir olgudur ve bu dengenin bozulması neoplastik dönüşüm ve malign büyüme ile sonuçlanabilir (Ilantzis, Demarte, Screatton, ve Stanners, 2002; Pignatelli vd., 1992; Solanas vd., 2008).

1.2 Kolorektal Kanser

Kanser, karmaşık ve çok yönlü bir hastalıktır. Temel olarak, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin baskılanması ile işlev kaybına yol açan, DNA'daki mutasyonların ardışık olarak edinilmesiyle veya normal gen ifadesini koordine eden epigenomun düzensizliğiyle yönlendirilen genetik bir hastalık olarak görülmüştür (Katti, Diaz, Caragine, Sanjana, ve Dow, 2022; Sparmann ve Van Lohuizen, 2006).

Kanser, çok hücreli canlıları 200 milyon yıldan fazla bir süredir etkilemiştir ve modern insanların ataları arasında bir milyon yıldan çok daha uzun geçmişe giden kanser kalıntıları vardır (Haberkorn, 2007).

Çeşitli mutasyonlar veya düzensizlikler sonucu sağlıklı hücrenin kontrol mekanizmaları bozulmakta ve tümör oluşumu gözlenmektedir. Bu durum, kanserin morfolojik, moleküler ve metabolik düzeyde birçok parametreye bağlı olmasının yanında hücresel kontrolün bozulmasından kaynaklanan farklı bileşenlerin etkileşimi ile oluşan kompleks bir hastalık olduğunu göstermektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000, 2011; Weinberg, 2014). Pek çok farklı kanser tipi olsa da kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayıran bazı ortak özellikleri vardır. Kanser hücrelerinin ayırt edici temel özellikleri olarak da ifade edilen söz konusu karakteristikler aşağıdaki şekilde belirtilebilir:

1. Hücre döngüsü kontrol noktalarından kaçış
2. Bağışıklık cevabından kaçış
3. Sınırsız kopyalama
4. Tümör tetikleyici kronik yangı
5. Farklı dokulara göç ve istila
6. Yeni damar oluşumunun artması
7. Genomda kararsızlık ve mutasyonlar
8. Hücresel ölüme karşı direnç
9. Hücresel enerji metabolizmasının bozulması
10. Sürekli büyüme sinyali aktifleşmesi

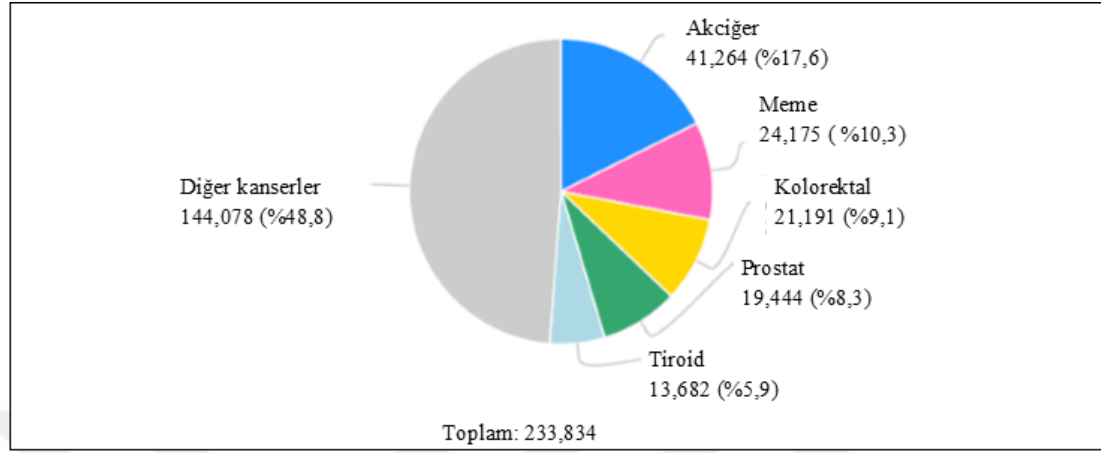
Sağlıklı hücre ile kanser hücresi arasında ortaya çıkan ilk temel farklılık, sağlıklı hücrenin doku ve organizmanın sağ kalımı için dikkatlice programlanmış olmasına karşılık, kanser hücresinin bu kontrolü kaybetmesi ve sadece kendisini çoğaltmaya yönelik programlaması olarak tanımlanabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Weinberg, 2014). Tümör kitlesi, sağlıklı doku ile kıyaslandığında, kanser hücreleri arasındaki yapısal düzensizlik dikkat çekmektedir. Hücrelerin çoğalmasını engelleyici ve yapısal formlarını düzenleyici mekanizmalar arasında yer alan hücre-hücre etkileşimi ve hücre-matriks etkileşimi kanser hücrelerinde ortadan kalkmaktadır. Kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere oranla tutunma yeteneği daha azdır. Bu durum, epitel hücrelerin yüzeyinde bulunan E-cadherin yapışma molekülü ifadesinin azalmasından kaynaklanmaktadır (Christofori ve Semb, 1999). Yapışma kapasitesi düşük olan tümör hücresinin hareket, istila ve metastaz potansiyeli artmaktadır. Kanser hücreleri, tutunma kapasitelerinin düşük olması sebebiyle çoğunlukla yuvarlak morfolojiye sahiptirler. Hücre-hücre etkileşimi sayesinde büyümekte olan hücrelerin birbiri ile teması sonucunda büyümelerinin engellenmesi gerçekleşmektedir. Bu durum, hücrelerin kontrollü çoğalmasını sağlayan önemli bir düzenleme mekanizmasıdır. Ancak kanser hücreleri azalmış hücre-hücre etkileşimi nedeniyle kontrolsüz olarak büyümeye ve çoğalmaya devam etmektedir (Cavallaro ve Christofori, 2000; Cooper ve Hausman, 2009; Yokota, 2000).

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında en yaygın kötü huylu tümörlerden biridir. Kolorektal kanser erkeklerde en sık teşhis edilen üçüncü, kadınlarda en yaygın ikinci kanser konumunda olup dünya çapında kanser ölümlerinin dördüncü önde gelen nedenidir (Wang vd., 2017).

Avrupa’da her yıl yaklaşık 250,000 yeni kolon kanseri vakası teşhis edilmekte olup söz konusu sonuç tüm malignitelerin yaklaşık %9’unu oluşturmaktadır (Lbianca vd., 2010).

Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) alt kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansına (IARC) göre Türkiye’de 2020 yılında yeni kanser vakası sayısı 233,834 ve kansere bağlı ölüm sayısı ise 126,335 olarak bildirilmiştir. Söz konusu veriler

incelendiğinde Türkiye’de kolorektal kanser hem erkekler hem de kadınlarda en sık görülen üçüncü kanser olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Türkiye’de 2020 yılı yeni vaka sayısı, her iki cinsiyet, her yaştan (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)

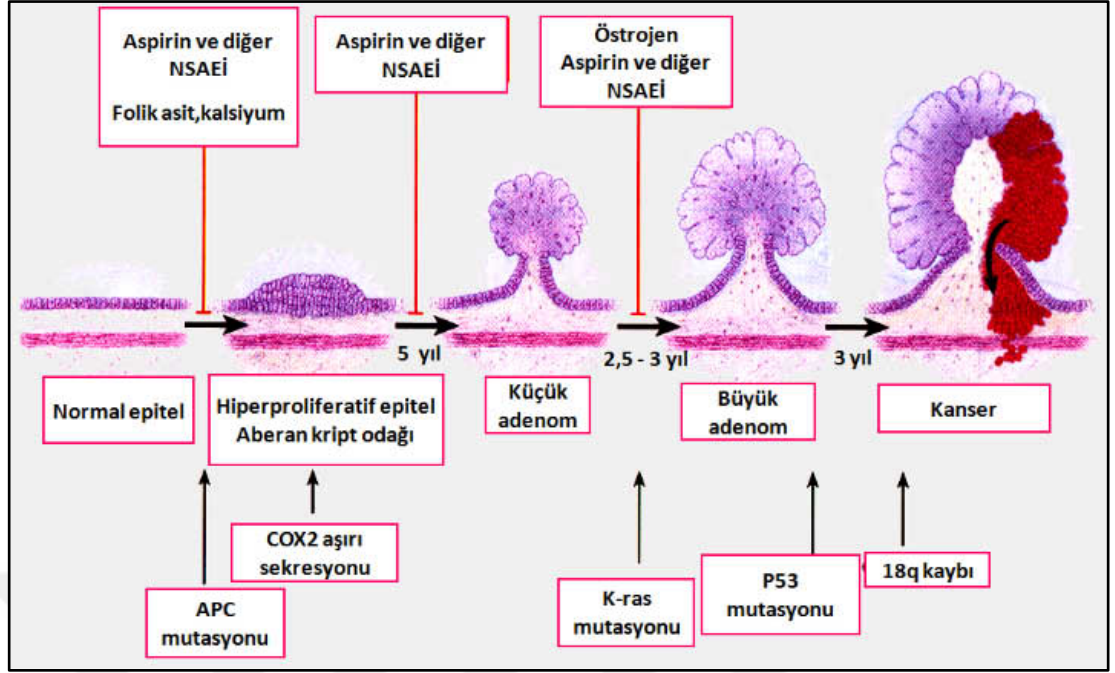
Kolorektal kanser (KRK), genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminden kaynaklanan heterojen bir hastalıktır ve dünya çapında en yaygın kanser türlerinden biri olsa da erken evrelerde tespit edilirse en iyileştirilebilir kanserlerden biri olabilmektedir (Nojadeh, Sharif, ve Sakhinia, 2018). Genetik mutasyonlar, diyet, bağışıklık sistemi ve mikrobiyota KRK gelişimi ve ilerlemesini etkiler (Nojadeh vd., 2018). Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü’nün yaptığı çalışmalara göre diyet ve fiziksel aktivite kolorektal kanserin önlenmesindeki iki önemli faktördür. Diyet, kolorektal kanser gelişimine etki eden önemli dış faktörlerden biridir (Lbianca vd., 2010).

'Klasik' kolorektal kanser oluşum modelinde, kanserlerin büyük çoğunluğu anormal bir kript ile başlayan ve daha sonra erken adenoma dönüşen bir polipten kaynaklanır. Adenom daha sonra gelişmiş adenoma (1 cm. boyutunda ve/veya villöz histolojiye sahip) dönüşür. Bu süreç, mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile yönlendirilir ve oluşması 10-15 yıl sürer ancak belirli ortamlarda (örneğin, Lynch sendromlu hastalarda) daha hızlı ilerleyebilir. Özellikle, geleneksel tübüler adenomların histolojisi oldukça homojen olmasına rağmen, bu poliplerin moleküler

biyolojisi heterojendir, bu durum bazı adenomların neden kolorektal kansere ilerlediğini (poliplerin yaklaşık %10'u) ve bazılarının neden ilerlemediğini açıklayabilir (Kuipers vd., 2015). Kolonda, normal epitel hücrelerin adenokarsinomaya evrimi, büyük ölçüde histolojik ve eşzamanlı epigenetik ve genetik değişikliklerin birikmesi sonucu oluşur (Kuipers vd., 2015).

Kolon kanseri genomlarının dizilenmesi, kolon kanseri genomunda bulunan yüzlerce mutasyondan yalnızca az sayıdaki gen mutasyonlarının işlevsel olarak önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır (yaklaşık 13.000 genin analizi yapılmış ve kolon kanseri genomundaki yaklaşık 67 genin kodlama dizisindeki mutasyonların kolon kanseri oluşmasında rol oynadığı tespit edilmiştir). Mutasyon görülen genlerden 12 genlik bir alt kümenin, tek tek kanserlerde kanser oluşumuyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Lao ve Grady, 2011).

Kolorektal tümörler ile ilgili yapılan bir çalışmada, sağlıklı hücrenin kanser hücresine dönüşümünün başlangıç aşamalarında APC tümör baskılayıcı geninin mutasyonu ile hiperplastik morfolojinin ön plana çıktığı, daha sonra ise K-ras onkogen mutasyonu ile aşırı yolak aktivasyonunu gerçekleştirdiği, 18. kromozomda bulunan tümör baskılayıcı genlerde ve hücre döngüsünün durdurulmasında rol oynayan p53 geninde oluşan mutasyonlar sonucunda, hücrenin malign fenotip kazandığı belirtilmektedir (Vogelstein vd., 1988) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Kolon kanseri oluşumu (<https://www.drahmetdobrucali.com>)

Kolorektal kansere neden olan çevresel ve genetik faktörler, kolon epitel hücresinde kanserin ayırt edici özelliklerinin kazanılmasını sağlar. Bu ayırt edici kanser özelliklerinin kazanılmasının bir yolu, onkogenleri aktive eden ve tümör baskılayıcı genleri etkisiz hale getiren genetik mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin ilerletici birikimidir (Kuipers vd., 2015). Mutasyonlar ve epigenetik değişimler, genomik kararlılığın kaybına sebep olmaktadır. Bu durum kolondaki erken neoplastik lezyonların çoğunda gözlenmiştir ve muhtemelen kolorektal oluşumun başlangıcında ve oluşumunda merkezi bir moleküler ve patofizyolojik olaydır. Genomik ve epigenomik kararlılığın kaybı, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin birikimini hızlandırırken bu durum malign özelliklere sahip daha agresif olan hücrelerin klonal genişlemesi ile kolon hücrelerinin malignant dönüşümüne sebep olmaktadır (Kuipers vd., 2015).

KRK'de somatik mutasyonlar, genetik kararsızlık, gen birleşmeleri ve epigenetik değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli patojenik mekanizmalar vardır. Etkili KRK tedavisi için hastalık mekanizmalarının daha fazla açıklığa kavuşturulması ve yeni

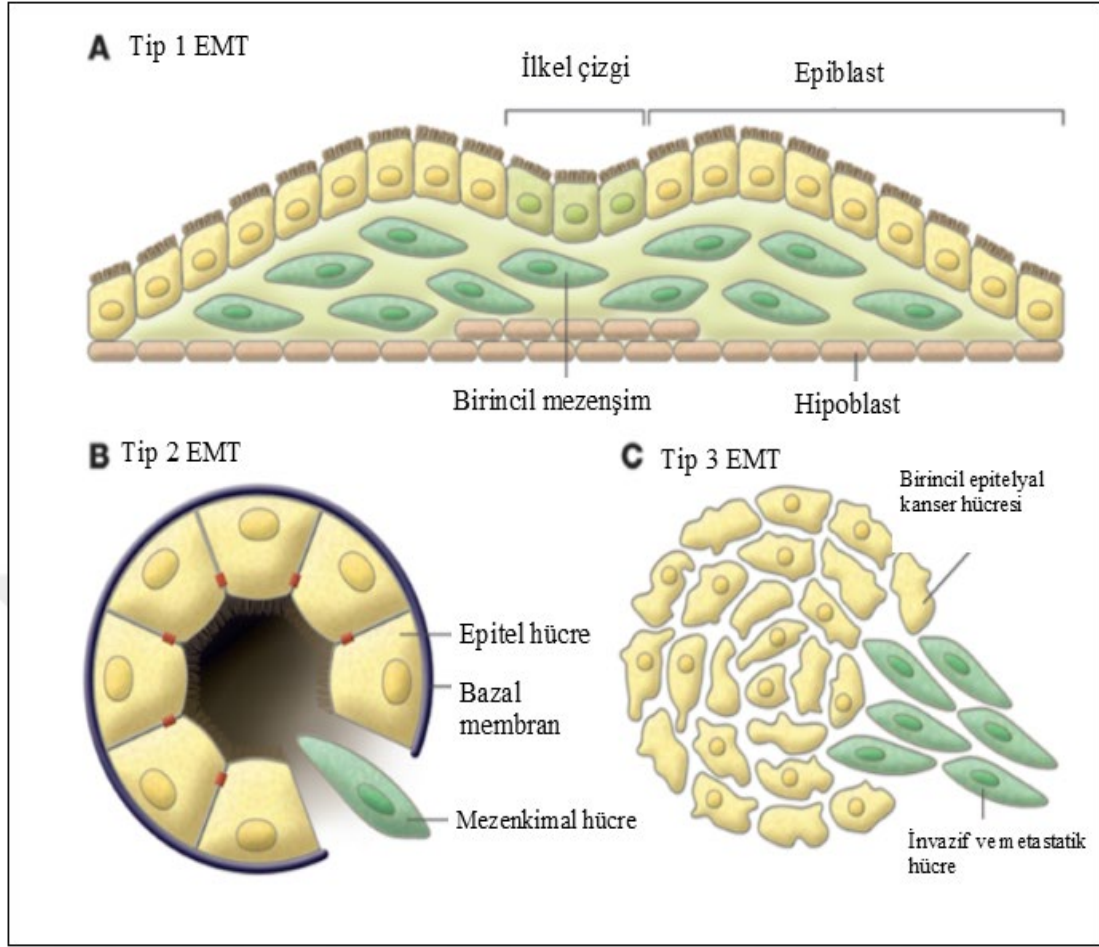
güçlü terapötiklerin geliştirilmesi halen ihtiyaç duyulan önemli durumlardan birini oluşturmaktadır (Liu, Guo, Lou, Xiang, ve Shao, 2022).

1.3 Epitel-Mezenkimal Dönüşüm (EMT)

Epitel hücreler yapışık bağlantılar, sıkı bağlantılar ve dezmozomlar yoluyla bitişik hücrelerle temasını koruyarak apikal-bazal polariteyi sağlarlar. Mezenkimal hücreler ise hücre dışı matriks ile birbirlerinden ayrılırlar. Mezenkimal hücreler kendilerini komşu dokudan ayıran bir bazal lamina yapısından yoksun olup epitel hücreler gibi belirgin bir apikal-bazolateral polariteye sahip değildirler (Ribatti, Tamma, ve Annese, 2020). Greenburg ve Hay (1982), embriyonik ve yetişkin ön lensten türetilen epitel hücrelerinin bir kolajen jel kültür sistemi kullanılarak üç boyutlu koşullarda muhafaza edildiklerinde polaritelerini kaybederek mezenkimal özellikler kazandıklarını gösteren ilk araştırmacılar olup bu durumu “epitelden mezenkimale dönüşüm (EMT)” olarak adlandırmışlardır.

EMT’nin ilk olarak 1980’lerin başında embriyonik gelişim sırasındaki önemli rolü (Mjaatvedt ve Markwald, 1989) ve daha sonra yaralanmaya karşı fizyolojik yanıtta etkisi tanımlanmıştır (Zhu, Gao, Wu, ve Qin, 2013). 1990’ların başında ise kanser hücrelerinin büyümesi, istilası ve metastazı ile EMT arasındaki ilişkinin keşfedilmesinden sonra EMT kanser araştırmacılarının dikkatini çekmiştir (Thompson vd., 1994).

Epitel hücrelerin mezenkimal özellik kazanması, bazı biyolojik süreçler sırasında meydana gelir ve üç tipte sınıflandırılır: Birinci tip embriyonik gelişim sırasında ortaya çıkar, ikinci tip yetişkin dokusu ile ilişkilidir ve üçüncü tip ise kanser ilerlemesinde rol oynar (Kalluri ve Weinberg, 2009; Zeisberg ve Neilson, 2009) (Şekil 1.4).



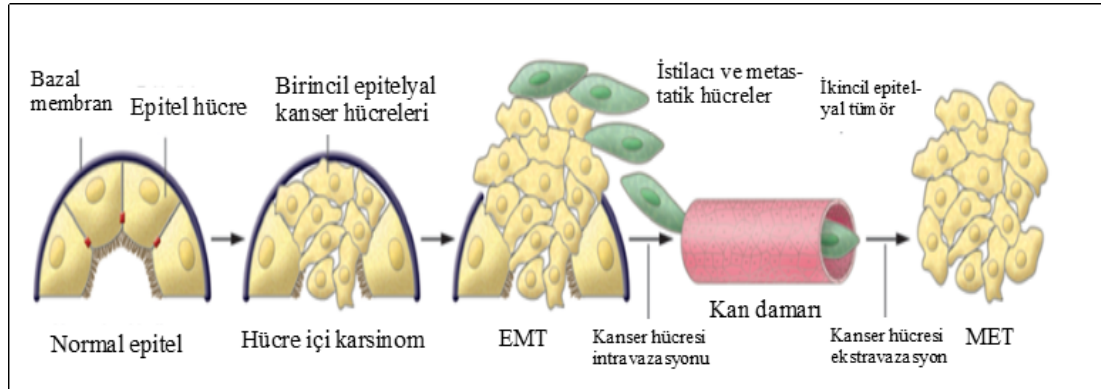
Şekil 1.4 Farklı EMT tipleri (Kalluri ve Weinberg, 2009)

Tip 1 EMT, implantasyon ve embriyonik gastrulasyon ile ilişkilidir ve mezoderm ve endoderm ile hareketli nöral krest hücrelerinin oluşmasına yol açar. İlkel epitel, özellikle epiblast, EMT yoluyla birincil mezenşimi oluşturur. Bu birincil mezenşim, MET (mezenkimal-epitel dönüşüm) tarafından ikincil epitel oluşturmak için yeniden tetiklenebilir. Bu tür ikincil epitelin, diğer epitel doku tiplerini oluşturmak üzere daha da farklılaşabileceği ve astrositler, adipositler, kondrositler, osteoblastlar ve kas hücreleri dahil olmak üzere bağ dokusu hücrelerini oluşturmak için EMT'ye maruz kalabileceği tahmin edilmektedir (Şekil 1.4.A). İnflamasyon ve fibrozda yeniden devreye giren EMT, tip 2 EMT'leri temsil eder. Tip 1 EMT'den farklı olarak, tip 2 EMT, uzun süre boyunca ifade edilir ve birincil inflamatuvar saldırı ortadan kaldırılmazsa veya azaltılmazsa, sonunda etkilenen organı yok edebilir (Şekil 1.4.B). Son olarak, birçok organda görülen ilişkili ikincil epitel, geçirdiği EMT sayesinde

invazyon ve metastaz özelliğine sahip kanser hücrelerine dönüşebilir, böylece tip 3 EMT'leri meydana getirir (Şekil 1.4.C) (Zeisberg ve Neilson, 2009).

Gastrulasyon sırasındaki embriyonik gelişim, böbrek gelişimi ve nöral krestin orijini sırasında meydana gelen EMT mekanizması, yüksek düzeyde düzenlenmiş bir süreç iken tümör ilerlemesi sırasında meydana gelen EMT mekanizması oldukça düzensizdir (Ribatti vd., 2020).

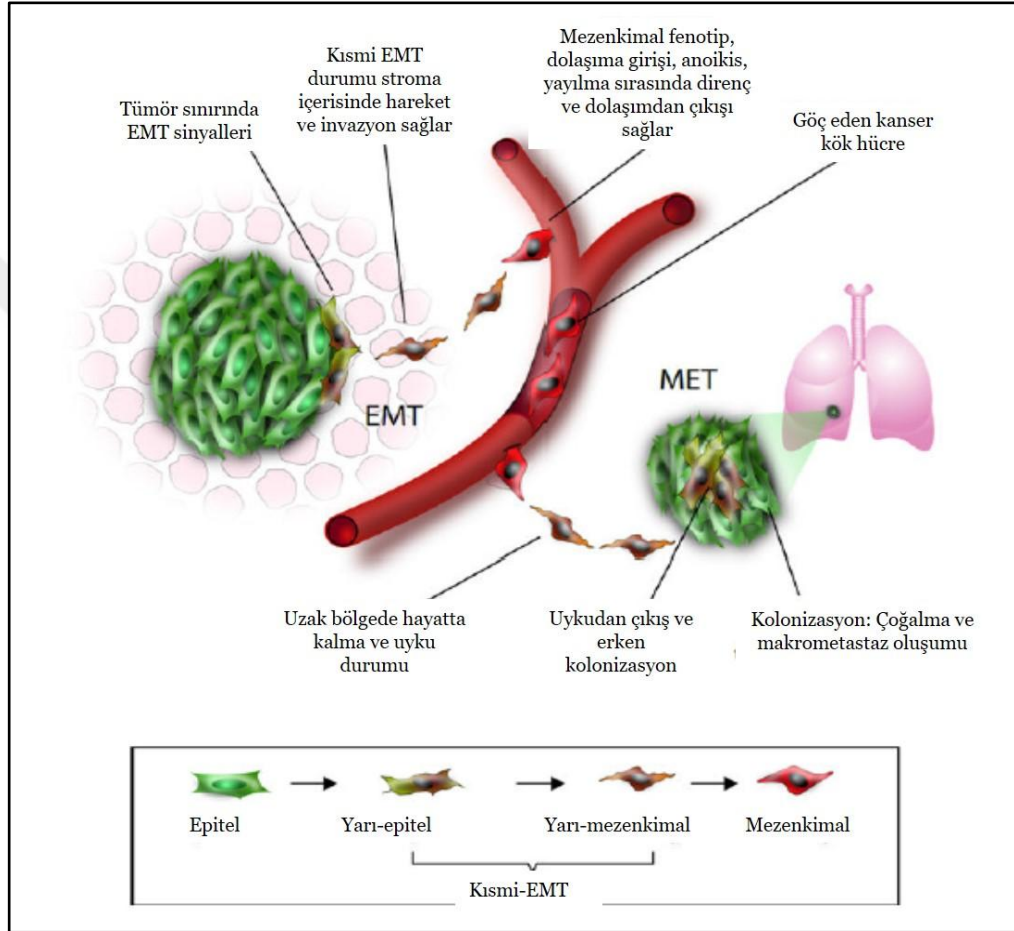
EMT, normal olarak bazal yüzeyi aracılığıyla bazal membran ile etkileşime giren polarize bir epitel hücrenin, gelişmiş göç kapasitesi, istila ve apoptoza karşı yüksek direnç gösteren bir mezenkimal hücre fenotipi kazanmasını sağlayan çoklu biyokimyasal değişikliklerin gerçekleştiği biyolojik bir süreçtir. EMT mekanizması ile normal epitelden invaziv karsinomanın oluşumu birkaç aşamada gerçekleşir (Şekil 1.5). İnvaziv karsinomanın oluşması aşamasında, epitel hücreler polaritelerini kaybederler ve bazal membrandan ayrılırlar. Bazal membranın bileşiminin de değiştiği bu durumdan hücre-hücre dışı matriks etkileşimleri ve sinyal ağları etkilenir (Kalluri ve Weinberg, 2009).



Şekil 1.5 EMT'nin kanser ilerlemesine katkısı (Kalluri ve Weinberg, 2009)

Bir sonraki adımda, tümör büyümesinin malign fazını kolaylaştıran EMT ve anjiyogenez mekanizması devreye girer. Epitel fenotipteki kanser hücrelerini geçici olarak yarı-mezenkimal bir duruma getiren tersine çevrilebilir EMT programı sayesinde, metastatik özellik kazanan kanser hücreleri kan dolaşımına girerler ve

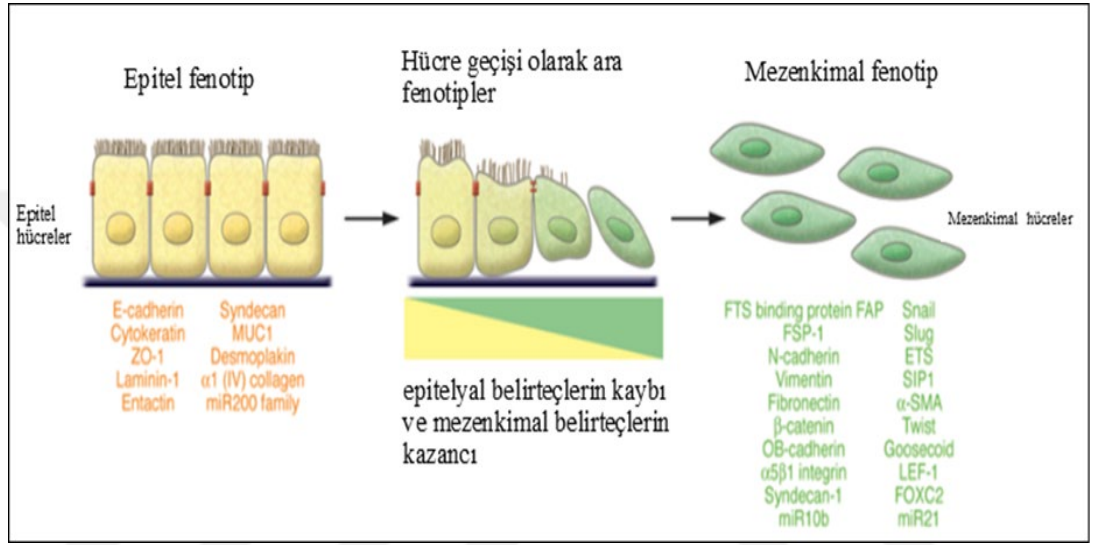
orijinleri olan dokudan uzak bir bölgeye göç ederler (Kalluri ve Weinberg 2009; Thiery, Acloque, Huang, ve Nieto, 2009). Uzak bölgede, kanser hücreleri MET mekanizması ile epitel fenotipi geri kazanarak dokulara yerleşmek suretiyle, ikincil tümörleri oluştururlar ve bu şekilde metastazın son adımı tamamlanmış olur (Pattabiraman vd., 2016) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6 Kanser gelişimi ve metastazda hücrelerin plastisitesini gösteren EMT ve MET (Tam ve Weinberg, 2013)

EMT'yi başlatmak ve tamamlanmasını sağlamak için birçok farklı moleküler süreç devreye girer. Bunlar; transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, spesifik hücre yüzeyi proteinlerinin ifadesi, hücre iskeleti proteinlerinin yeniden düzenlenmesi ve ifadesi, hücre dışı matriks parçalayıcı enzimlerin üretimi ve spesifik mikroRNA'ların ifadelerindeki değişiklikler olabilir. Çoğu durumda, ilgili faktörler ayrıca bir hücrenin

EMT spektrumundaki yerini karakterize etmek için biyobelirteç olarak kullanılır. Çalışmalarda yaygın olarak kullanılan epitel ve mezenkimal hücre belirteçleri Şekil 1.7’de gösterilmiştir. Literatürdeki birçok çalışma, prostat, akciğer, pankreas, karaciğer, kolorektal ve safra kanseri de dahil olmak üzere pek çok karsinom tipinde EMT belirteçlerinin varlığı ile kötü hasta prognozunun ilişkisini göstermiştir (Shibue ve Weinberg, 2017).



Şekil 1.7 Epitel-mezenkimal dönüşüm hücre belirteçleri (Kalluri ve Weinberg, 2009)

Tümör hücreleri EMT mekanizması sayesinde invazyon ve metastaz kabiliyeti kazanmalarının yanı sıra apoptoz, antitümör ilaçlar ve immün baskılamaya karşı dirençli hale gelirler ve kanser kök hücreleri (CSC) gibi davranırlar (Polyak ve Weinberg 2009; Thiery vd., 2009). CSC ve CSC olmayan (non-CSC) hücreler arasındaki fark büyük oranda EMT'ye bağlıdır. Pek çok karsinomda sadece CSC alt popülasyonunda bulunan neoplastik hücreler aktif EMT programı göstermektedir (Chen vd., 2009; Mani vd., 2008; Pang vd., 2010). Belirli deneysel karsinom modellerinde, epitel tümör hücrelerinde EMT programının dışarıdan aktive edilmesi, bu hücrelerin tümör başlatma kapasitelerini kayda değer miktarda artırmıştır (Chen vd., 2009; Mani vd., 2008).

1.3.1 Kolon Kanserinde EMT

Kolon kanserinin, Bates ve Mercurio (2005) tarafından epitelyal-mezenkimal geçiş mekanizmasının ayrıntılı olarak tanımlanması için uygun bir model olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi kolon kanserinde de EMT tersine çevrilebilir bir program olarak etki göstermektedir.

Kolon adenokarsinomunda epitel fenotipteki kanser hücrelerini geçici olarak yarı-mezenkimal bir duruma getiren EMT'nin yanı sıra tam EMT de görülmektedir. Tam EMT, E-cadherinin kaybı, polaritenin bozulması ve sitokeratinlerin vimentin ile yer değiştirmesi ile sonuçlanmaktadır (Klymkowsky ve Savagner, 2009). EMT'de anahtar bir olay olan E-cadherinin ekspresyon kaybı (Scazecz, 2009) ve bununla birlikte N-cadherin ile yer değiştirmesi (Rosivatz vd., 2004) hücrelerin hareket özelliği kazanmasında da önemlidir. Bu ifade kaybı, E-cadherin gen promotorunun metillenmesi ve *Snail*, *Slug* ve *Twist* gibi transkripsiyon faktörlerinin aracılık ettiği transkripsiyonunun baskılanması da dahil olmak üzere çeşitli moleküler mekanizmalar ile düzenlenmektedir (Jung vd., 2008).

Kolon kanserinde, deneysel ve klinik çalışmalar, mezenkimal belirteç olan fibronektinin reseptörü integrin alfa-V beta-6'nın önemli bir rol oynadığını göstermektedir. İntegrinin sadece bölgesel invazyonu kolaylaştırmakla kalmayıp kolondan karaciğere metastaz yapmış hücrelerin karaciğer dokusunda hayatta kalması için seçici bir avantaj sağlayarak metastatik yayılmayı da kolaylaştırdığı  ne sürülmüştür (Bates ve Mercurio, 2005).

EMT, kolorektal kanserde göç etme ve istila yeteneğinin kazanılması gibi önemli bir role sahip olmasına ilaveten doku fibrozunda da etkilidir (Thiery, 2003).  nemli bir diğer nokta ise diğer kanserlerde olduğu gibi kolon kanserinde de EMT'nin ortaya çıkışı ve invaziv özelliklerin kazanılmasına, büyüme faktörü reseptörlerinin tetiklenmesi ve apoptoz direnç mekanizmaları gibi hücre hayatta kalma mekanizmalarının aktifleşmesinin de eşlik etmesidir (Bates ve Mercurio, 2005).

1.4 Epigenetik Düzenlenme

DNA dizisinde kalıcı değişikliklerle sonuçlanmayan gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanan epigenetik, KRK dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin patogeneğinde merkezi bir role sahiptir. Epigenetik değişiklikler; özellikle DNA metillenmesi, histon modifikasyonları, kolorektal kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemlidir (Jung, Hernandez-Illan, Moreira, Balaguer, ve Goel, 2020).

Karsinom hücreleri metastaz sürecinde EMT ve MET'i dönüşümlü olarak aktifleştirebilmekte ve bu durum hücre fenotiplerinin plastisitesini göstermektedir. Adı geçen plastisite ise çoğunlukla bu süreçte meydana gelen epigenetik değişimlere bağlıdır. Pek çok kanıt, normal hücreler ve tümör hücrelerinde EMT'nin DNA dizisindeki değişimler sonucu değil, epigenetik bir süreç olarak düzenlendiğini göstermektedir (Tam ve Weinberg 2013). Bu epigenetik değişiklikler, genom çapındaki kayıpların yanında bölgesel DNA metilasyon kazanımlarını ve histon modifikasyon modellerini içerir (Sparmann ve Van Lohuizen, 2006). Kanser hücrelerinin ve oluşturdıkları tümörlerin davranışlarını etkileyen epigenetik düzenlenme mekanizmalarının araştırılması yeni hız kazanan ve açığa çıkarılmayı bekleyen bir durumdur (Shibue ve Weinberg, 2017).

Detaylı olarak çalışılmış malignitelerden biri olan kolorektal kanser, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanan karmaşık bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Grady ve Carethers, 2008). Kolorektal kanserde yapılan araştırmalar sonucunda, çoğalma, farklılaşma, adezyon, apoptoz, hücre döngüsü ve DNA onarımında rol oynayan birkaç önemli genetik mutasyon tanımlamıştır (Wood vd., 2007). Bunların yanı sıra somatik DNA mutasyonları ile kıyaslandığında epigenetik düzenlenmedeki anormallikler daha fazladır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, anormal epigenetik ortamın, kolorektal kanserin başlamasına ve ilerlemesine ilave bir karmaşıklık ekleyebileceğini öne sürmektedir. Bu epigenetik değişikliklerin tersinir ve dinamik doğası, kolorektal kanserde teşhis, prognostik ve terapötik hedefler için potansiyel biyobelirteçler olarak gelişmelerini sağlamıştır (Lao ve Grady, 2011).

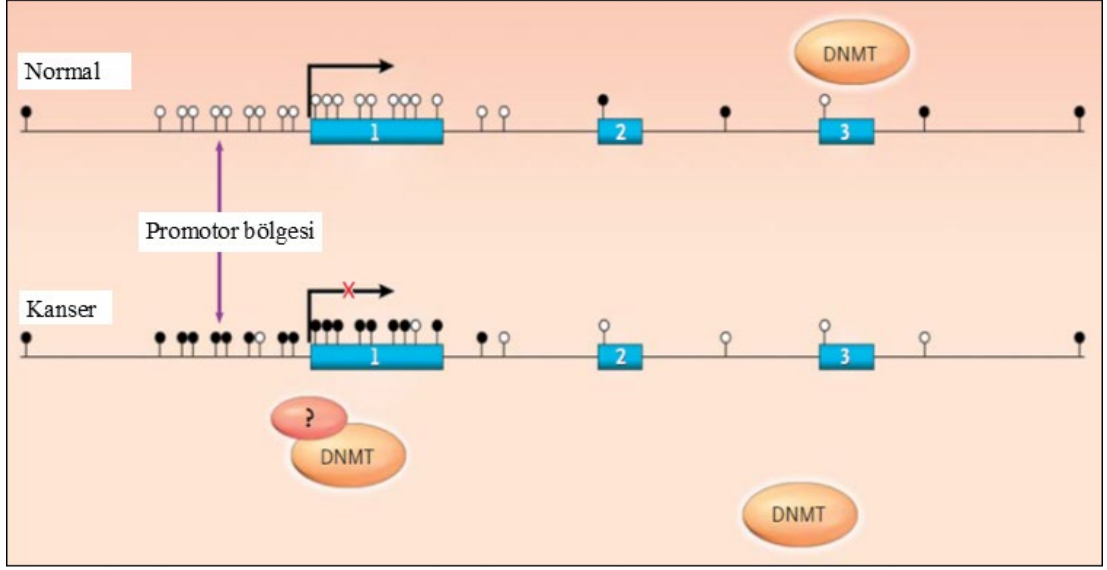
1.4.1 DNA Metilasyonları

Epigenetik mekanizmalar arasında, DNA metilasyonu belki de kolorektal kanserde en çok çalışılan epigenetik değişikliktir. Önemli olarak, promotor CpG (sitozin-fosfat-guanin) adası hipermetilasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin baskılanması, kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilmiştir (Herman ve Baylin, 2003). Söz konusu durum kolorektal kanser hastalarında erken evrelerde bile sıklıkla ortaya çıkmaktadır (Van Engeland, Derks, Smits, Meijer, ve Herman, 2011; Yi vd., 2012).

Sadece dört baz - adenin, guanin, sitozin ve timin - DNA'nın birincil dizilimini açıklasa da, replikasyon sonrası DNA'nın kovalent bir modifikasyonu vardır ve bir "beşinci baz" üretir. Metil donörü olarak S-adenosil-metiyonin kullanan ve DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) adı verilen enzimler tarafından katalizlenen tepkimeler, sitozin halkasına bir metil grubu ekleyerek metil sitozin oluşturur. İnsanlarda ve diğer memelilerde, bu modifikasyon sadece DNA dizisindeki guanozinden (CpG dinükleotidi) önce gelen sitozinlere uygulanır (Herman ve Baylin, 2003).

Kolorektal kanserdeki anormal metilasyon durumlarının daha iyi anlaşılması, epigenetik olarak susturulmuş genleri yeniden aktive etmekten sorumlu enzimleri hedefleyen ajanların geliştirilmesine ışık tutmuştur. Örneğin, DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri ve histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri gibi bazı epigenetik terapötikler ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından kanser tedavisi için onaylanmıştır (Dhanak ve Jackson, 2014).

Kanser hücrelerinde anormal DNA metilasyon örüntüleri 20 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. İncelenen hemen hemen tüm kanser türlerinde hem CpG dinükleotitlerinin çoğunun metillenmesi gereken CpG-tüketilmiş bölgelerde metilasyon kaybı hem de gen promotör bölgelerindeki CpG adalarının metilasyonunda kazanımlar olduğundan durum kafa karıştırıcı olmuştur (Şekil 1.8) (Bakker vd., 1985; Feinberg ve Vogelstein, 1987).



Şekil 1.8 İnsan genomunda CpG dinükleotidinin dağılımı ve normal hücreler ile tümör hücreleri arasındaki metilasyon paternlerindeki farklılıklar (Herman ve Baylin, 2003).

Devam eden araştırmalardan elde edilen olası açıklamalar ve bulgular olmasına rağmen, DNA-metilleyici enzimlerin normalde oldukları yerde neden metilasyonda başarısız oldukları ve bu enzimlerden hangisinin promotorlardaki CpG adalarının anormal metilasyonuna aracılık ettiği bilinmemektedir (Herman ve Baylin, 2003).

DNA CpG metilasyonu ile birlikte kromatin yeniden şekillenmesi, gen ekspresyonunu düzenleyen anahtar mekanizmalardan ikisidir. Kromatinin yeniden şekillenmesi, histon proteinlerinin kuyruklarındaki korunmuş lizin modifikasyonlarından oluşur. Lizin asetilasyonu genellikle histonların DNA ile ilişkisini zayıflatarak ve transkripsiyon faktörlerinin (TF) promotor/arttırıcı bölgelere bağlanmasına ve ardından transkripsiyonel aktivasyona izin vererek transkripsiyonu arttırmasını sağlar (Wu vd., 2020). Lizin metilasyonu ise lizin aminoasitlerine metil grubu eklenmesiyle gerçekleşir. Lizin aminoasitlerine metil ekleyen enzim metiltransferazdır.

1.4.2 Histon Metilasyonu ve Polycomb Proteinleri

Son on yılda, çeşitli histon değiştirici enzimler tarafından katalizlenen, transkripsiyonel olarak aktif ve baskılayıcı histon işaretlerinin oluşumu, gen düzenlenmesinin mihenk taşı olarak kabul edilmiştir (Agger vd., 2008). Bu post-translasyonel modifikasyonlar, kromatin üzerine yazıcı enzimler tarafından eklenir, siliciler tarafından kaldırılır ve okuyucular bunlara bağlanır. Örneğin, histon metiltransferazlar ve demetilazlar nükleozom alt birimlerinin lizin amino asidine ve özellikle histon H3 ve H4'e, sırasıyla metil grubu ekler ve çıkarırlar. Bu şekilde bütünleşik etki ederek bu modifikasyonlar, DNA'nın nasıl paketleneyeceğini ve böylece o bölgedeki genlerin transkripsiyon potansiyelini belirler. Güncel çalışmalar, DNA'ya diziye özel bağlanan EMT-TF'ler ve histon modifikasyonlarıyla kontrolü sağlanan kromatin biçimlenmeleri arasında ilginç bağlantılar ortaya çıkarmıştır (Tam ve Weinberg, 2013). Bu modifikasyonlar, hücre kaderi belirlenmesinde yer alan genlerin promotorlarını denge durumunda tutarlar. Bu dengenin nasıl sağlandığı halen belirsizdir ve bu bölgelerin kromatin organizasyonu ve promotor aktivitesinin düzenlenmesinde post-translasyonel histon modifikasyonlarının katkıları araştırılması gereken bir konudur.

Kromatin değiştirici aktivitesiyle öne çıkan iki önemli sistem, Trithorax grup (trxG) ve Polycomb gruptur (PcG). Sinekler, maya ve memelilerde TrxG protein komplekslerinin bir grubu aktif transkripsiyon işareti olan H3 lizin 4'e üç metil grubu (H3K4me3) eklenmesini katalizler. Histon 3'ün (H3K4) lizin 4'te trimetilasyonu genellikle gen ifadesinin aktivasyonu ile ilişkilidir, oysa histon 3'ün lizin 27'de (H3K27) trimetilasyonu gen ifadesinin baskılanması ile ilişkilidir.

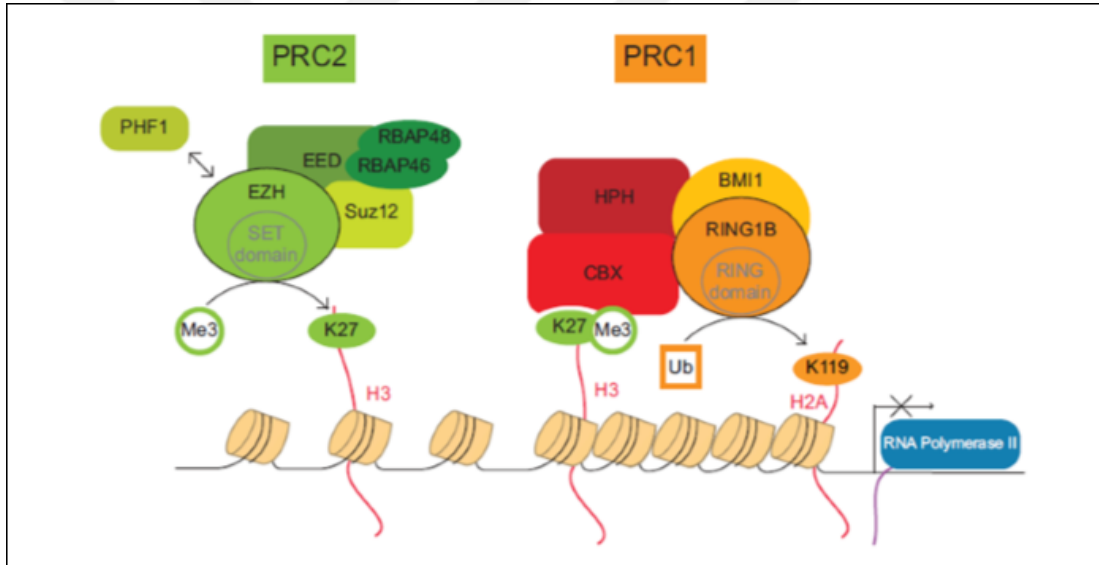
H3K4 metilasyonu, çeşitli ökaryotik türlerde özel olarak transkripsiyonel aktivasyona bağlı olan bir post-translasyonel modifikasyondur (Eissenberg ve Shilatifard, 2010; Ruthenburg, Li, Patel, ve Allis, 2007; Shilatifard, 2008; Zoetemelk, Rausch, Colin, Dormond, ve Nowak-Sliwinska, 2019). Son zamanlarda, transkripsiyonel durumların epigenetik kalıtımında H3K4 metilasyonunun rolü, *Dictyostelium*'da yapılan işlevsel bir çalışma ile güçlendirilmiştir (Justin, De Marco,

Aasland, ve Gamblin, 2010). Memelilerde, omurgalı gelişiminin düzenleyici karmaşıklığı içinde özel işlevler gerçekleştiren, bilinen veya tahmin edilen en az 10 H3K4 metiltransferaz vardır (Justin vd., 2010). İlk H3K4 metilaz kompleksi, COMPASS (Tritoraksla ilişkili bir SET alanı proteini ile ilişkili bir protein kompleksi), *S. cerevisiae* mayasında tanımlanmış ve Set1/KMT2 ve diğer yedi polipeptitten (Cps60-Cps15 olarak adlandırılır) oluşmuştur (Miller vd., 2001). Set1/KMT2 tek başına enzimatik olarak aktif değildir, ancak COMPASS içinde işlev görür ve H3K4'ü monometilleme, dimetilleme ve trimetilleme yeteneğine sahiptir (Shilatifard, 2008).

PcG proteinleri ise çok alt birimli Polycomb baskılayıcı kompleksler 1 ve 2'yi (PRC1 ve PRC2) oluşturur. PRC2'nin dört alt birimi vardır: EZH1 veya EZH2, zinc finger proteini SUZ12, WD-tekrar proteini EED ve histon bağlayıcı proteinler RBAP46 ve RBAP48 (Cao vd., 2002; Czermin vd., 2002; Kuzmichev, Nishioka, Erdjument-Bromage, Tempsts, ve Reinberg, 2002; Müller vd., 2002). PRC1; RING1A veya RING1B enzimatik alt birimi, insan polihomeotik homologlarından (HPH1, HPH2 veya HPH3) biri olan PCGF ailesinin bir RING alanı kofaktörü BMI1 (PCGF2) veya MEL18 (PCGF4) ve kromobox proteinlerinden birini bulundurur (CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 veya CBX8) (Simon ve Kingston, 2009).

PcG proteinleri hem erken gelişim hem de erişkin organizmalarda baskılanmış kromatin oluşumunun önemli işareti olan H3 lizin 27 metillenmesini (H3K27me3) katalizleyerek genin baskılanmasını sağlarlar (Schuettengruber, Bourbon, Di Croce, ve Cavalli, 2017). Epigenetik gen susturma, gen işlevinin kaybı için önemli bir mekanizmadır ve kanser başlaması ve ilerlemesinde genetik mutasyonlarla işbirliği yapar. PcG proteinleri, epigenetik olarak aracılık edilen transkripsiyonel susturmayı düzenler. PRC aracılı kararlı gen susturma için kesin mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamıştır. Transkripsiyonel olarak doğrudan engelleme için, H2AK119'un PRC1 aracılı ubiquitilasyonu (Ub) (Gutierrez vd., 2012; Stock vd., 2007), kromatin sıkıştırması (Francis vd., 2004) ve PRC2 tarafından gen bölgelerini hedeflemek için DNA metiltransferazların (DNMT'ler) toplanması gibi mekanizmalar önerilmektedir (Sparmann ve Van Lohuizen, 2006).

Memeli hücrelerinde epigenetik susturmaya, polycomb bazlı histon H3 lizin 27 trimetilasyonu (H3K27me3) ve H3K9 dimetilasyonu gibi en az iki farklı histon modifikasyonu aracılık eder. H3K27, homeotik (Hox) gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve kadınlarda X kromozomu inaktivasyonunun erken aşamalarında yer alan belirgin bir histon modifikasyonudur. Bu işlem, PcG proteinlerini içermesi bakımından H3K9 susturma işleminden mekanik olarak farklıdır. Polycomb kompleksi 2'nin (PRC2) bir üyesi olan EZH2 polycomb grubu (PcG) proteini, H3K27 için substrat spesifikliğı olan bir histon metiltransferaz aktivitesine sahiptir (Kondo vd., 2008). H3K27'nin metilasyonu PRC2 tarafından katalizlenir, sonrasında H3K27me3 işareti PRC1 tarafından okunur ve hedef genlerin susturulmasına yol açar (Justin vd., 2010).



Şekil 1.9 Polycomb-baskıcı kompleksler (PRC'ler) ve enzimatik aktiviteleri (Vissers, Van Lohuizen, ve Citterio, 2012)

PRC2 (Polycomb baskılayıcı kompleks 2) başlatma kompleksinin Polycomb grubu (PcG) hedef gen bölgesine bağlanması, histon proteinlerinin EZH1 veya 2 aracılı metilasyonunu tetikler (Cao vd., 2002; Czermin vd., 2002; Kuzmichev vd., 2002; Müller vd., 2002). Histon 3'ün 27. lizinine üç metil grubunun eklenmesini (H3K27me3) katalizler. PRC1 kompleksindeki CBX proteinlerinin kromobölgesi H3K27me3 işaretini tanır (Fischle vd., 2003; Min, Zhang, ve Xu, 2003). Bu etkileşim,

PRC1'in ilgili gen bölgesini susturmasını sağlar (Fischle vd., 2003; Min, Zhang, ve Xu, 2003; Wang vd., 2004).

İşaretili histonları tanıyan ve bunlara bağlanan, epigenetik “okuyucu” protein ailelerinden biri olan Polycomb chromobox (CBX) proteinlerinin beş üyesi bulunmaktadır: CBX-2, CBX-4, CBX-6, CBX-7 ve CBX-8. PRC1 kompleksinin parçası olan CBX proteinlerinin her üyesi H3K27me3'e farklı çekim kuvveti ile bağlanır (Schuettengruber vd., 2017). Pluripotent embriyonik kök hücrelerle yapılan bir çalışmada bu hücrelerde en çok bulunan CBX üyesinin CBX-7 olduğu ve farklılaşmanın gerçekleşmesi için CBX-7'nin, CBX-2, CBX-4 ve CBX-8 gibi diğer paraloglarla değiştirilmesi gerektiği gösterilmiştir. Bu değişimin gerçekleşmemesi, hematopoietik kök hücrelerin yüksek hızda bölünmesine ve böylece lösemiye yol açmıştır (Klauke vd., 2013). CBX-6'nın gen düzenlenmesi ve kök hücre farklılaşmasındaki rolü halen karmaşıktır. Esasen CBX proteinleri PRC1'e, embriyonik kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki dengenin kurulması gibi, belirgin bir hedef seçiciliği sağlamaktadır (Klauke vd., 2013; Tang vd., 2014). Dolayısı ile CBX proteinlerinin kanserdeki rolü tamamen hücrenin/dokunun durumuna özgü olabilir.

Gerek embriyonik gerekse erişkin kök hücrelerde PcG'nin bağlandığı çok sayıda bölge hem baskılayıcı H3K27me3 işareti hem de aktifleştirici H3K4me3 işareti ile kaplıdır (Shema vd., 2016). Bu modifikasyonlar, hücre kaderinin belirlenmesi ve gelişimde yer alan genlerin promotorlarını bivalent denge durumunda tutarlar (Piunti ve Shilatifard, 2016). Tümör gelişiminde bivalent promotor üzerinde bulunan PcG'lerin rolü tartışmalıdır. Kesin olarak bilinen, H3K27me3 seviyelerindeki bir dengesizliğin gerek hücre kimliğini gerekse homeostaziye bozabilecek etkileri olduğudur. Kolon kanserli dokularda H3K27me3 Polycomb işaretinin bivalent promotorlardan kaybolduğu ve bunu takiben kanser ilerlemesi, kök hücre düzenleyicileri, onkogen ve bölünme ile ilgili gen ifadelerinin arttığı belirlenmiştir (Hahn vd., 2014).

Kök hücre popülasyonunca zenginleştirilmiş birincil insan meme epitel dokularında CDH1 (E-cadherin epitel belirteç) promotorunun bivalent yapıya sahip olduğu ve az miktarda üretildiği fakat E-cadherini çokça üreten daha farklılaşmış hücrelerin sadece aktif H3K4me3 işaretini taşıdığı gösterilmiştir (Maruyama vd., 2011). Belirli EMT genlerindeki bivalent biçimlenme, gen ifadesinin dinamik bir şekilde kontrolünü sağlamakta ve epitel hücrelerin plastik doğasına katkıda bulunmaktadır.

1.5 EMT Modelleri

Literatürde EMT modeli olarak kimyasal (Ör; TGF- β) ile veya gen manipülasyonu ile tetiklenen modeller sıklıkla kullanılmaktadır. Bir kimyasal ile tetiklenme olmadan kendiliğinden EMT ve bunun geri döndürülebilir modellerine çok sık rastlanmamaktadır.

Kimyasal ile tetiklenen modele örnek olarak akciğer epitel hücreleriyle yapılan bir çalışmada EMT, dönüştürücü büyüme faktörü β 1 (TGF- β 1) ile indüklenmiştir. EMT geçiren mezenkimal hücrelerin de fibrozis patogeneze katkıda bulunduğu varsayılmıştır (Mikami vd., 2016). Yapılan bir başka çalışmada ise EMT için bir in vitro model olarak, HT-29 KKK hücreleri, TGF- β 1 ile indüklenmiştir. Sonrasında bu hücrelerde epitel (E-cadherin) ve mezenkimal (Vimentin, Fibronektin) belirteçlere bakılmıştır (Özçelik, 2018). Bir başka çalışmada ise araştırmacılar, yüksek verimli tarama (HTS) ilaç keşfi için uygun yeni bir 3D EMT ve metastatik meme kanseri modeli geliştirmişlerdir. Bu çalışmada EMT'yi tetiklemek için epidermal büyüme faktörü (EGF) kullanılmıştır. Bu modelde, vimentin ekspresyonu mezenkimal fenotiple doğrudan ilişkilidir (Li vd., 2011).

Bir başka çalışmada araştırmacılar matrigeldeki ölümsüzleştirilmiş dönüştürülmemiş insan prostat epitel hücre hattı BPH-1'in 3D kültür koşullarını optimize etmiş ve prostat bezi yapısını yakından taklit eden bir 3D kültür modeli geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu modeli BPH-1 hücrelerinde EMT düzenleyici transkripsiyon faktörü *Snail* stabil transdüksiyonu ile prostat kanseri gelişiminde *Snail*'in önemini incelemek için kullanmışlardır (Chu, Yu, Hayward, ve Chan, 2009).

Yapılan başka bir çalışmada EMT'yi aktive etmek için BRCA1 geni susturulmuştur. Bunun sonucunda EMT'nin BRCA1 kaybıyla ortaya çıkan moleküler yönlerini yönetmede TGF β R2' nin rolünün ne olduğuna bakılmıştır. BRCA1'in susturulmasının meme tümörlerinde TGF β R2 sinyal yollarını aktive ettiğini ve TGF β -aracılı EMT aktivasyonunu desteklediğini tespit etmişlerdir (Bai vd., 2022).

Bir başka çalışmada çeşitli meme, kolon ve pankreas kanseri hücre hatlarıyla çalışılmış ve MET'i tetiklemek için daha önce farklı kanser hücre dizilerinde EMT düzenlemesine katkıda bulunduğu gösterilen sekiz doğal bileşik ve çeşitli terapötik ajanlar kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda doğal bileşiklerin veya terapötik ajanların hiçbirinin, taranan tüm kanser hücrelerinde MET'i tetiklemediği gözlenmiştir. Bunun sonucunda bulgular, doğal bileşikler ve kemoterapötikler/hedefli ajanlar arasındaki sinerjinin yalnızca bazı hücre dizileri için gözlemlenebildiğini ve altta yatan mekanizmanın muhtemelen MET'nin basit indüksiyonu değil, diğer birkaç mekanizmanın kombinasyonu olduğuna karar vermişlerdir (Küçükkaraduman, 2021).

Bir çalışmada Caco-2 hücre hattında in vitro EMT modeli oluşturularak EMT'ye karşı direnç mekanizmalarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada farklılaşma 0., 15. ve 30. günlerde takip edilmiş ve model validasyonu için epitel ve mezenkimal belirteçler (E-cadherin ve Vimentin) kullanılmıştır (Türk, Baysal, ve Uçar, 2019)

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde genellikle EMT'nin kimyasal ile tetiklendiği modellerle karşılaşılmaktadır. Az sayıda kendiliğinden EMT modeli kullanılmış olsa da EMT ve MET'in ard arda ve aynı genetik alt yapıda gözlenebildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

1.5.1 HT-29 Hücre Hattı

İnsan kolon adenokarsinoma hücre dizisi HT-29, 1964 yılında Fogh ve Trempe tarafından 44 yaşında bir Kafkas kadınının birincil tümöründen izole edilmiştir (Fitzgerald vd., 1997).

J. Fogh ve arkadaşları tarafından kurulan kolon karsinomu hücre hatları Caco-2 ve HT-29, olgun enterosit benzeri özellikler gösteren belirli kültür koşullarında farklılaşma yetenekleri nedeniyle dikkat çekmiştir (Pinto vd., 1982, 1983). Bu hücreler, farklılaştıklarında, morfoloji ve fırça kenarlı hidrolazların ekspresyonu açısından bağırsak epitel hücrelerine çok benzerler. Normal kolon hücreleri bu enzimleri eksprese etmediğinden, farklılaşmış kolon hücrelerinde bağırsak fırça kenar hidrolazlarının ekspresyonu dikkat çekicidir. Daha sonra aynı hidrolazların aslında fetal kolonda da bulunduğu anlaşılmıştır (Lacroix vd., 1984).

Ancak bu hücrelerin genomlarında mutasyonlar barındıran kötü huylu hücreler olduğu da akılda tutulmalıdır ki bu da modelin önemli bir dezavantajını oluşturmaktadır. Bu dezavantajlara rağmen, HT-29 hücre dizisi, bağırsak epitelinin farklılaşmasının in vitro modellerinden biri haline gelmiş ve dünya çapında yaygın olarak kullanılmıştır (Simon-Assman vd., 2007).

Bu tez çalışmasında HT-29 hücre hattının bu özelliği ilk kez MET-EMT programı için bir model olarak geliştirilmiş ve kullanılmıştır. HT-29 hücrelerinin kendiliğinden farklılaşabilme özelliği bu model için seçilmelerinde etkili olmuştur. Bu çalışmada kullanılan hücre modelinin, bir hücre hattı olması sebebiyle örnek içi heterojenliği azdır ve ilk aşama verilerinin elde edilmesinde, replikeler arası hata payını azaltarak avantaj sağlamaktadır. Bu model dışarıdan herhangi bir kimyasal uygulanmadan gerçekleştirildiği için hücre içi değişimlerin doğala yakın izlenebilmesini sağlamaktadır. Literatürde bu modelin daha önce ileri ve geri EMT geçişleri için kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

BÖLÜM İKİ

MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Hücre Kültürü

Mevcut çalışmada, EMT-MET modeli olarak hücre kültürü ortamında spontan olarak farklılaşabilen kolon kanseri HT-29 hücre hattı kullanılmıştır. HT-29 hücre hattı, yüksek glukoz tüketimine sahiptir ve normal hücre kültürü koşullarında farklılaşmamıştır. Hücreler farklı hücre kültürü koşullarında belirli epitel hücre tiplerine dönüşebildikleri için pluripotent olarak değerlendirilmektedir. HT-29 hücreleri glukozun galaktoz ile değiştirilmesiyle geri döndürülebilir bir enterosit farklılaşması göstermektedir (Pinto vd., 1982; Sade Memişoğlu, 2014). Bu sürecin geri çevrilebilir olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Zweibaum vd., 1985).

HT-29 hücreleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümü Sreeparna Banerjee Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. HT-29 hücrelerinde farklılaşmanın tetiklenmesi için daha önce Pinto vd. (1982) tarafından geliştirilen glukoz yerine galaktoz besiyeri yöntemi kullanılmıştır. HT-29 hücreleri 25 mM glukoz ve %10 FBS içeren DMEM besiyerinde (Glu-besiyeri) 37°C'de büyütülmüş ve farklılaşmanın tetiklenmesi için %80 doluluğa eriştiklerinde glukoz yerine 5 mM galaktoz ve %10 ısı ile inaktif edilmiş FBS içeren (Gal-besiyeri) besiyeri ile değiştirilmiştir.

Hücreler Glu-besiyerinde %50-60 doluluk oranına erişene kadar büyütülmüş sonrasında bu hücreler atasal hücreler (aHT-29) olarak toplanmıştır. Hücreler %80 doluluk oranına ulaştıkça glukoz yerine Gal-besiyerine alınmış ve %100 doluluğa eriştiklerinde 0. gün olarak kabul edilip 20 gün boyunca Gal-besiyerinde büyütülmüştür. Bu sürenin sonunda toplanan hücreler epitel özellik gösteren farklılaşma grubu olarak ifade edilmiştir (eHT-29). 21. günde hücreler tripsin ile dağıtılarak 1:50 oranında hücre kültürü kaplarına ekilmiş ve glu-besiyerinde 4 gün süre ile büyütülmüştür. Dört günün sonunda toplanan hücreler mezenkimal özellik gösteren geri farklılaşma grubunu oluşturmuştur (mHT-29).

Yapılan deneylerde atasal HT-29 (aHT-29), 20. gün epitel (eHT-29) ve geri farklılaşmış mezenkimal (mHT-29) olarak 3 tip hücre popülasyonu kullanılmıştır. Belirtilen zamanlarda hücreler toplanıp protein izolasyonları yapılmış ve ilgili deneylerde kullanılmıştır.

2.2 Protein İzolasyonu ve Protein Miktarının Ölçümü

aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerinden total protein izolasyonu için PMSF (fenilmetilsülfonil florür) ve proteaz inhibitörü ilave edilen fosfataz inhibitör kokteyli içeren hücre lizis tamponu kullanılmıştır. Protein izolasyonu için şırınga ile 10 defa pipetaj yapılmıştır. Süpernatantlar 15 dakika buzda bekletilmiş ve 3 dakikada bir vortekslenmiştir. Süpernatanda protein tayini Bradford Assay kullanılarak ölçülmüştür. Bradford Assay Protokolü aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır.

1X stok Bradford reaktifinden 5 µl standart veya örnekleri içeren kuyulara 200 µl eklenmiş ve plakalar oda sıcaklığında 15 dakika süreyle bekletilmiştir. 595 nm dalga boyunda plaka okuyucuda ölçüm yapılmıştır. 25-2000 µg/ml aralığında bovine serum albümin ile standart grafiği oluşturulmuştur.

2.3 Western Blot

Western blot analizleri için örnekler öncelikle %12 SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve PVDF membrana transfer edilmiştir. Bir sonraki aşamada membran %5'lik süt tozu ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda bir saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu işlemde sonra membran ilgili proteine uygun primer antikor ile buzdolabında +4°C'de çalkalayıcıda bir gece boyunca bekletilmiştir. Sonraki gün membran TBST ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkanmış ve membrana sekonder antikor uygulanmıştır. Membran oda sıcaklığında bir saat sekonder antikorla muamele edildikten sonra yeniden TBST ile yıkama işlemi yapılmıştır. Son aşamada membran substratlar (ECL Plus, Pierce) ile muamele edilmiş ve kemiluminesans sinyal tespit edilmiştir.

2.4 EMT Belirteçleri ile Karakterizasyon

aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerinin EMT spektrumunun hangi noktasında olduğunu tespit etmek için bu hücrelerde epitel ve mezenkimal belirteçlerin miktarları tespit edilmiştir. Bu amaçla epitel belirteçler için E-cadherin, CDX-2 (Cell Signaling); mezenkimal belirteçler için transgelin, vimentin (Cell Signaling) antikorları kullanılmıştır.

2.5 MET-EMT Sürecinde Polycomb Proteinlerinin Değişimi

aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerinde önemli epigenetik düzenleyicilerden Polycomb proteinlerindeki ve H3K27me3/H3K4me3 miktar değişimleri incelenmiştir. Bunun için EMT/MET sürecinde PRC2 üyesi EZH paralogları (EZH1 ve EZH2) ve PRC1 üyesi CBX paralogları (CBX-2, CBX-4, CBX-6, CBX-7 ve CBX-8)'nın miktarlarındaki değişim Western blot ile aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerinde analiz edilmiştir.

2.6 Hücre Çoğalmasının Ölçümü

aHT-29, eHT-29, mHT-29 hücrelerinin çoğalma hızlarını karşılaştırmak için hücre çoğalma testi uygulanmıştır. Bunun için hücreler 96-kuyucuklu plakalara 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve CellTiter Aqueous Assay Kit (Promega) kullanılarak üreticinin protokolüne göre ölçüm yapılmıştır (Pattabiraman vd., 2016). Hücrelerin 0., 24. ve 48. saatteki çoğalma hızları hesaplanmıştır.

2.7 Hücre Canlılık Testi

aHT-29, eHT-29, mHT-29 hücrelerinin günümüz kolon kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direncini ölçmek için hücre canlılık testi (MTT) yapılmıştır. Kolon kanserinde günümüzde kullanılan en yaygın tedavi Oxaliplatin + 5-florourasil (5-FU) kombinasyonudur (Zoetemelk vd., 2019; Todaro vd., 2007). Hücreler 10.000 hücre olarak 96-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücrelere ekim yapıldıktan 24 saat

sonra farklı dozlarda ilaç uygulanması gerçekleştirilmiştir. Oxaliplatin için sırasıyla 5, 25, 50, 100 ve 250 μM ; 5-FU için ise sırasıyla 50, 100, 250, 500 ve 1000 μM ilaç uygulanmıştır. Hücreler ilaçla muamele edildikten 24 saat sonra hücrelere MTT reaktifi (5 mg/ml) verilmiş ve hücreler 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Dört saat sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO’da çözülüp absorbansı 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

2.8 İstatistiksel Analizler

Çalışmada, her deney en az üç biyolojik tekrar, western blot örnekleri ise beş biyolojik tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farklar One-way ANOVA testi kullanılarak Graph-Pad Prism 5 programıyla analiz edilmiştir. İstatistiksel analizlerde anlamlılık için $p < 0,05$ değeri baz alınmıştır.

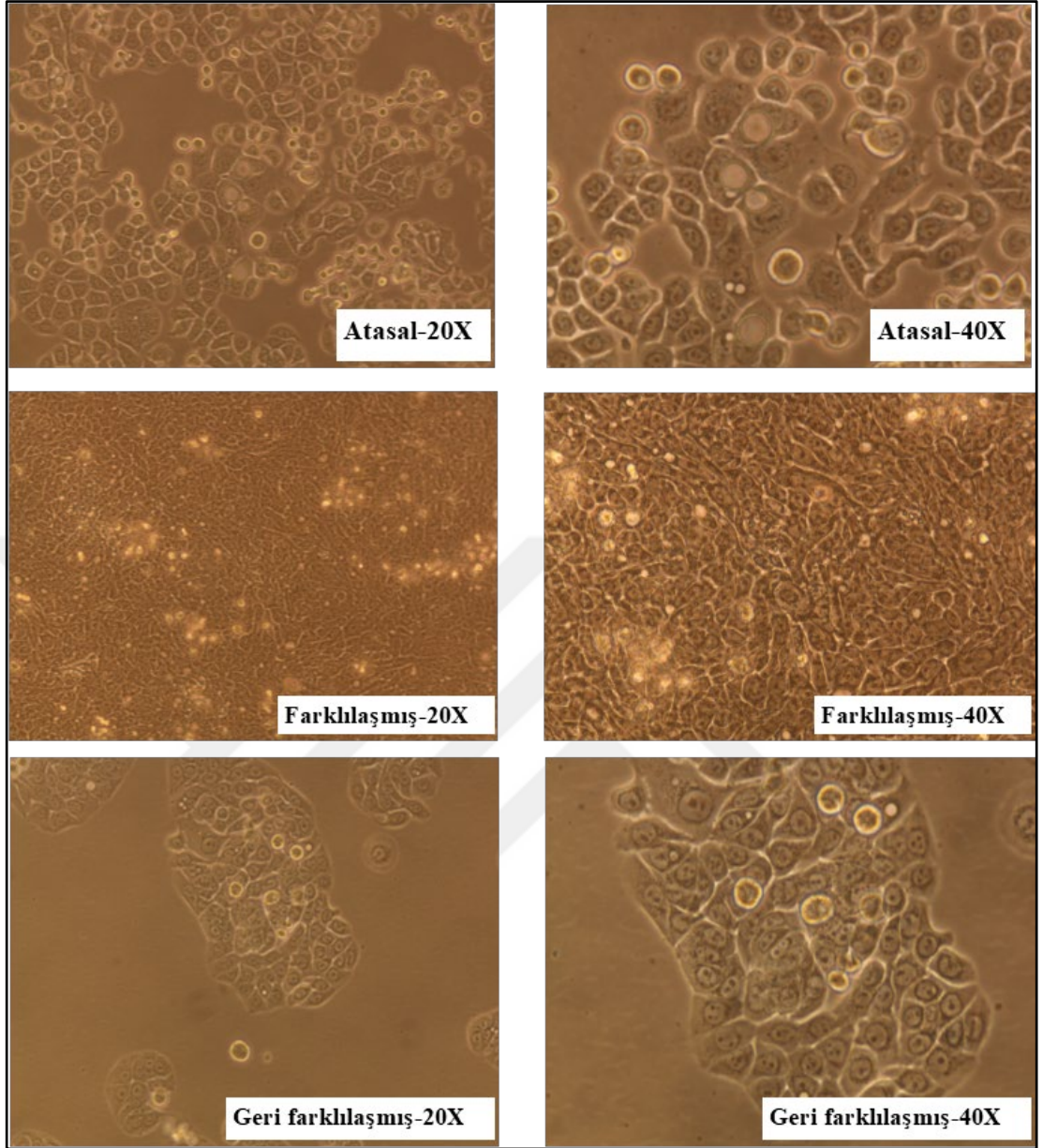
BÖLÜM ÜÇ

BULGULAR

Bu çalışmada HT-29 hücrelerinde MET-EMT modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan bu model sonucu aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 olmak üzere üç tane alt popülasyon elde edilmiştir. Bu alt popülasyonların epitel-mezenkimal karakteristikleri ve epigenetik belirteçleri incelenmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise bu üç alt popülasyonda ilaç direnci ve hücre canlılığı tespit edilmiştir.

3.1 Farklılaşan ve Geri Farklılaşan HT-29 Hücrelerinde Morfolojik Özellikler

HT-29 hücrelerinin %100 doluluğa eriştikten sonra Gal-besiyerinde büyütülerek 20 gün ve sonrasında tripsinlenerek seyreltilip 4 gün Glu-besiyerinde büyütülmeleri sonunda mikroskop görüntüleri alınmış ve karşılaştırılmak üzere Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1 HT-29 hücrelerine ait 20X ve 40X mikroskop görüntüleri (Kişisel arşiv, 2022)

Yapılan inceleme neticesinde atasal hücreler ile geri farklılaşma grubunu oluşturan hücrelerin morfolojik yapılarının birbirlerine benzerlik gösterdikleri gözlenmiştir. Farklılaşma grubu hücrelerinin ise morfolojik olarak atasal ve geri farklılaşma grubuna ait hücrelerden belirgin farklar içerdikleri belirlenmiştir.

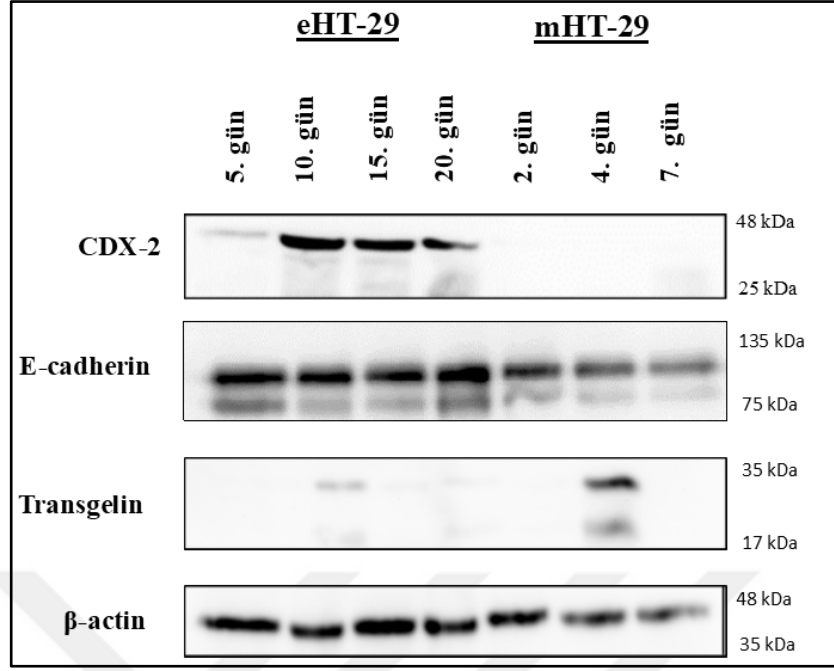
Atasal ve geri farklılaşmış hücreler üstel olarak büyüme göstermeleri nedeniyle hücre sınırları çok belirgin değildir. Buna karşılık farklılaşmış hücrelerde sınırlar daha

belirgindir. Diğer taraftan farklılaşmış hücreler yoğun olmaları nedeniyle sıkışık bir durum sergilemekte ve bu durum da hücrelerin tek tek morfolojileri hakkında yorum yapmayı güçleştirmektedir.

3.2 HT-29 MET-EMT Modeli Optimizasyonu

Literatürde her ne kadar HT-29 farklılaşması iyi karakterize edilmişse de bu süreç boyunca ve özellikle de geri farklılaşma sırasında epitel ve mezenkimal fenotip ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle süreç boyunca farklı günlerde epitel ve mezenkimal belirteçlerin protein miktarları tespit edilmiştir.

Öncelikle MET-EMT modelini geliştirmek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu sebeple %80 doluluk oranına ulaşınca glukoz yerine Gal-besiyerine alınan ve %100 doluluğa eriştiklerinde 0. gün olarak kabul edilen hücreler sırasıyla 5., 10., 15. ve 20. günlerde toplanmıştır. Sonrasında bu hücrelerde epitel ve mezenkimal belirteçlerin protein miktarı tespit edilmiştir. Bu şekilde farklılaşma grubu için hangi günde toplanan hücrelerin kabul edileceğine karar verilmiştir. Aynı durum geri farklılaşma grubu için de geçerlidir. 21. günde tripsin ile dağıtılan hücreler 1:20 oranında hücre kültürü kaplarına ekilmiş ve glu-besiyerinde sırasıyla 2, 4, ve 7 gün süre ile büyütülmüş ve aynı belirteçler incelenmiştir (Şekil 3.2).

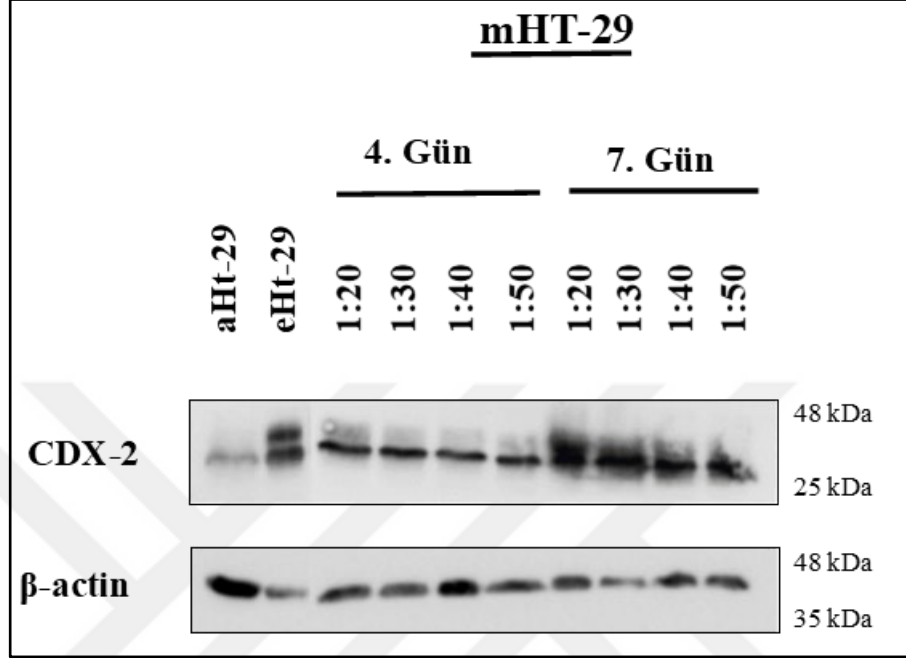


Şekil 3.2 MET-EMT sürecinin optimizasyonu. Epitel (CDX-2, E-cadherin) ve mezenkimal (Transgelin) belirteçlerin Western blot görüntüleri

Epitel ve aynı zamanda farklılaşma belirteci olan CDX-2 proteinin düzeyleri, eHT-29 alt popülasyonunda farklılaşma sürecinde artış gösterirken CDX-2 proteini mHT-29 alt popülasyonunda geri farklılaşmanın 2. gününden itibaren tespit edilememiştir (Şekil 3.2). Diğer bir epitel belirteç olan E-cadherin düzeyi farklılaşmanın 20. gününe doğru artarken geri farklılaşma sürecinde azalmakta fakat tamamen yok olmamaktadır (Şekil 3.2). Mezenkimal belirteç olan transgelin ise geri farklılaşmanın olduğu yani mezenkimal özelliklerin geri kazanıldığı 4. günde görülürken, 7. gün örneklerinde ise Transgelin proteini belirlenememiştir (Şekil 3.2). 7. günde hücre yoğunluğunun %70-80'i geçmesi nedeniyle söz konusu durum, hücrelerin kendiliğinden epitel özelliklerini geri kazanabildiklerini düşüncesini akla getirmektedir. Bu optimizasyon adımı sonrasında epitel dönüşümün 20. günde gerçekleştiği görülmüştür. Bu nedenle sonraki çalışmalarda sadece 20. gün epitel hücreleri kullanılmıştır.

Geri farklılaşma gruplarında hücre yoğunluğundan dolayı hücrelerin tekrar epitel farklılaşma sürecine girebildikleri düşünülerek 20 gün farklılaşan hücreler, tripsinle toplanmıştır. Bir sonraki aşamada hücreler farklı oranlarda (1:20, 1:30, 1:40 ve 1:50)

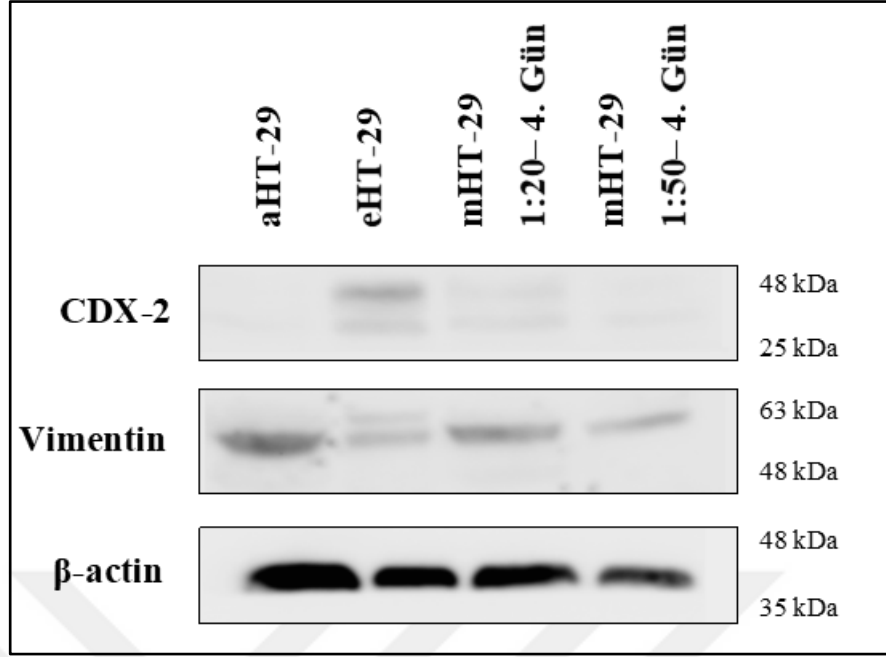
ekilmiş, 2., 4. ve 7. günlerde toplanarak hücrelerdeki CDX-2 protein miktarları belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Mezenkimal farklılaşma sürecinin optimizasyonu. Epitel belirteci CDX-2'nin Western blot görüntüleri (kDa: kilodalton)

eHT-29 hücreleri ile geri farklılaşmış hücreler kıyaslandığında, CDX-2 protein düzeyindeki düşüşün geri farklılaşmanın 4. günde gerçekleştiğini ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.3). Şekil 3.3 incelendiğinde, geri farklılaşmış hücrelerde 7. günde tekrar epitel dönüşüm sürecine girişin ortaya çıktığı görülmektedir. Mikroskop ile hücreler sürekli takip edildiğinde de 1:50 oranında ekilen hücrelerin, %50-60 doluluk oranında oldukları görülmüştür.

4. gün mezenkimal hücreleri için 1:20 ve 1:50 oranları ile epitel (CDX-2) ve mezenkimal (Vimentin) belirteçler ile yapılan tespitler modelin optimizasyonunun son aşamasını oluşturmuştur (Şekil 3.4).

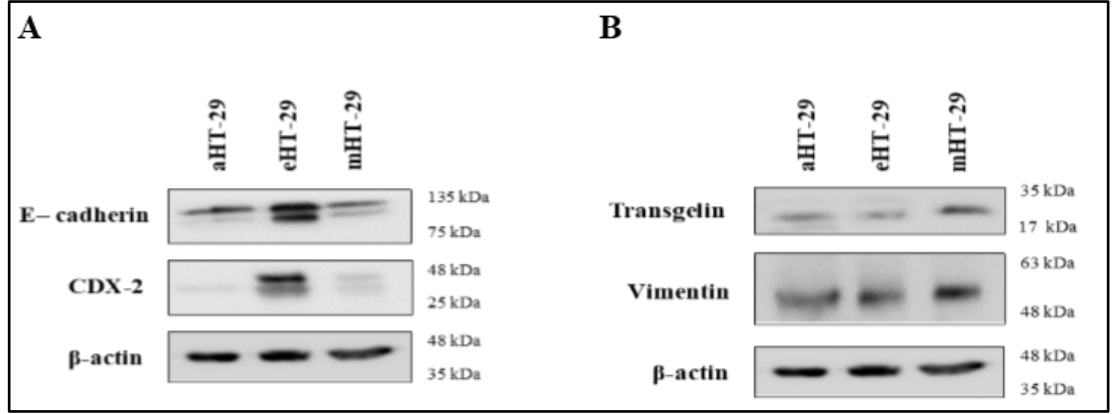


Şekil 3.4 Optimize örneklerin WB analizi

Şekil 3.4’de görüldüğü gibi epitel farklılaşma belirteci olan CDX-2 20. günde artarken mezenkimal farklılaşmada azalmıştır. Mezenkimal belirteç olan vimentin, epitel farklılaşma örnekleri eHT-29’larda azalırken mezenkimal farklılaşma örneklerinde artmıştır. Bu da geri farklılaşmanın yani mezenkimal değişimin olduğuna işaret etmektedir. Dolayısı ile, epitel dönüşüm için farklılaşmanın 20. gün hücreleri ve mezenkimal dönüşüm için ise geri farklılaşmanın 4. gün gruplarında, hücre yoğunluğunun az olduğu 1:50 oranı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

3.3 HT-29 MET-EMT Modelinde Epitel ve Mezenkimal Belirteçler

HT-29 hücrelerinde kendiliğinden gerçekleşen MET ve EMT’nin doğrulanması amacı ile atasal, epitel ve mezenkimal hücre popülasyonlarında epitel (E-cadherin, CDX-2) ve mezenkimal (Transgelin, Vimentin) belirteçlerin protein miktarları tespit edilmiştir (Şekil 3.5).

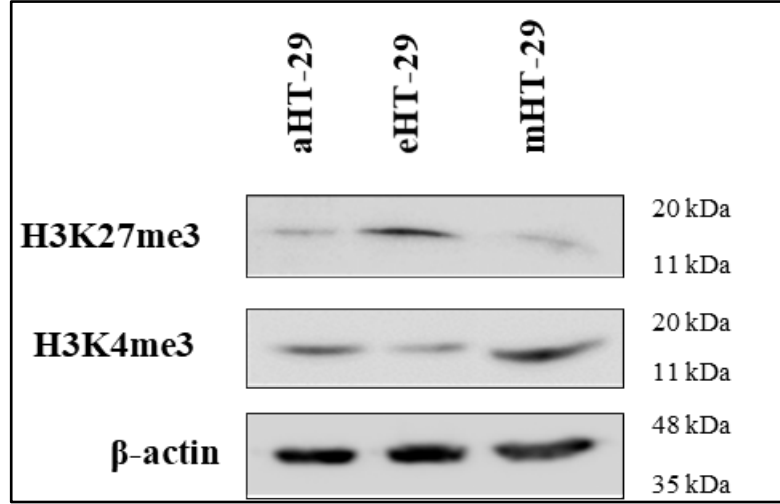


Şekil 3.5 HT-29 MET-EMT modelinde (A) epitel ve (B) mezenkimal belirteçlerin Western blot analizi

Şekil 3.5’de görüldüğü üzere epitel özellik göstermesi beklenen 20. gün hücrelerinde epitel belirteçler E-cadherin ve CDX-2 miktarları artmıştır. Mezenkimal özellik göstermesi beklenen geri farklılaşma grubunda ise epitel belirteçlerin miktarları azalmıştır. Mezenkimal belirteç olan transgelin ve vimentin miktarları eHT-29 hücrelerinde azalırken mHT-29 hücrelerinde artış göstermiştir. Bu da modelin doğruluğunu ispatlamaktadır. Ayrıca atasal gruplarla mezenkimal grupların birbirlerine benzer özellik gösterdikleri de görülmektedir.

3.4 HT-29 MET-EMT Modelinde Histon Modifikasyonları ve Polycomb Üye Proteinlerindeki Değişimler

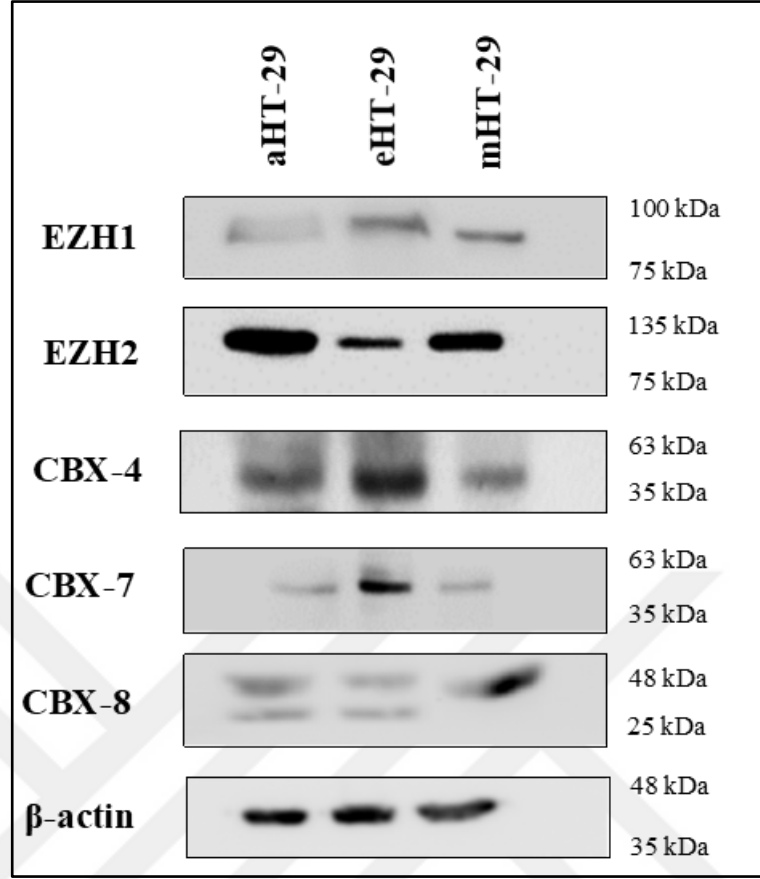
HT-29 MET-EMT dönüşümlerinde etkili olabilecek epigenetik mekanizmalardan H3K27me3/H3K4me3 histon modifikasyonlarındaki değişim miktarları incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.6’da verilmiştir.



Şekil 3.6 HT-29 MET-EMT modelinde H3K27me3/H3K4me3 protein miktarlarının Western blot görüntüleri

HT-29 MET-EMT modelinde atasal ve mezenkimal grupta, H3K27me3 miktarının azaldığı, buna karşılık H3K4me3 miktarının ise arttığı görülmektedir. Epitel grupta ise durum bunun tam tersi olup, epitel grupta H3K27me3 miktarı artarken H3K4me3 miktarı azalmaktadır (Şekil 3.6).

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, H3K27me3 modifikasyonundan sorumlu PRC2 üyesi EZH paralogları (EZH1 ve EZH2), ve bu modifikasyonun okuyucularından PRC1 üyesi CBX paraloglarına ait (CBX-2, CBX-4, CBX-6, CBX-7 ve CBX-8) protein miktarları belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.7’de gösterilmiştir.

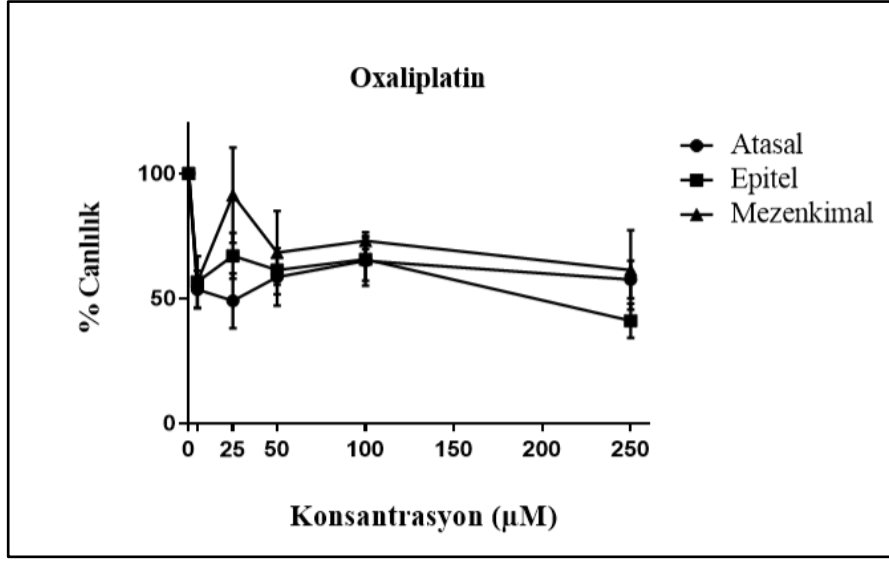


Şekil 3.7 HT-29 MET-EMT modelinde Polycomb protein miktarlarının Western blot görüntüleri

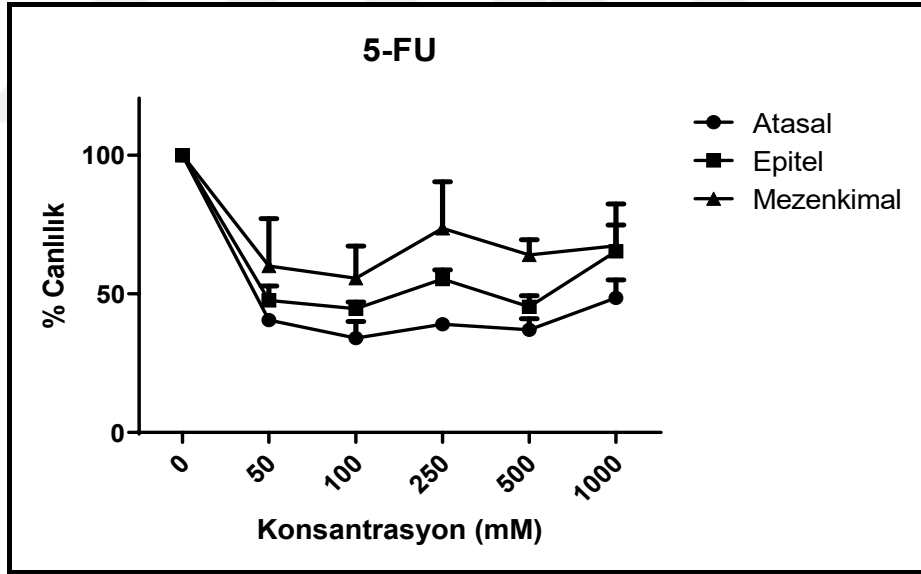
eHT-29 hücrelerinde, EZH1, CBX-4, CBX-7 miktarları artarken, CBX-8 ve EZH2 miktarları ise azalmıştır (Şekil 3.7). mHT-29 hücrelerinde ise EZH1 ve CBX-4 miktarının azalırken, CBX-7'nin neredeyse tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan, mHT-29 hücrelerinde, CBX-8 ve EZH2'nin epitel hücrelere göre çok daha fazla ifade edildiği görülmektedir (Şekil 3.7).

3.5 HT-29 MET-EMT Modelinde İlaç Hassasiyeti

HT-29 MET-EMT modelinde ilaç direncinin belirlenebilmesi amacı ile atasal, epitel ve mezenkimal HT-29 hücrelerinin kolorektal kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan oxaliptatin ve 5-florourasil (5-FU) hassasiyetleri karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.8 ve 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.8 Atasal, epitel ve mezenkimal HT-29 hücrelerinde oxaliplatin ilaç hassasiyeti MTT sonuçları. Her bir veri noktası n=3, ortalama±SEM göstermektedir



Şekil 3.9 Atasal, epitel ve mezenkimal HT-29 hücrelerinde 5-FU ilaç hassasiyeti MTT sonuçları. Her bir veri noktası n=3, ortalama±SEM göstermektedir

aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerine oxaliplatin için sırasıyla 5, 25, 50, 100 ve 250 μM ; 5FU için ise sırasıyla 50, 100, 250, 500 ve 1000 μM ilaç uygulanmış ve hücrelerin ilaçlara karşı direnci hücre canlılık testi (MTT) ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre her iki ilaç için de aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 grupları arasında ilaç dozlarıyla ilişkili istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p<0,05$).

Oxaliplatin için mezenkimal hücrelerin genellikle daha yüksek canlılık oranına sahip olduğu saptanmış, 250 μM konsantrasyon ilaç dozunda atasal ve mezenkimal hücrelerin benzer canlılıkta olduğu fakat epitel hücrelerdeki ölümün daha yüksek oranda olduğu gözlenmiştir. Bu durum epitel hücrelerin atasal ve mezenkimal hücrelere kıyasla oxaliplatine karşı daha hassas olduğunu göstermektedir.

5-FU ilaç dozları için atasal hücrelerde canlılığın genelde daha düşük seyrettiği, mezenkimal grupta ise farklı ilaç dozlarında hücre canlılığının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. 5-FU 1000 μM ilaç dozunda epitel ve mezenkimal hücrelerin benzer ve atasal gruba göre daha yüksek bir canlılık oranı gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısı ile mezenkimal hücrelerin epitel ve atasal gruplara göre, 5-FU'e daha dirençli oldukları söylenebilir.

İlaç uygulamaları sonucunda hücrelerin %50'sini öldüren minimum ilaç dozu (IC50) belirlenmiş olup Tablo 1'de topluca verilmiştir.

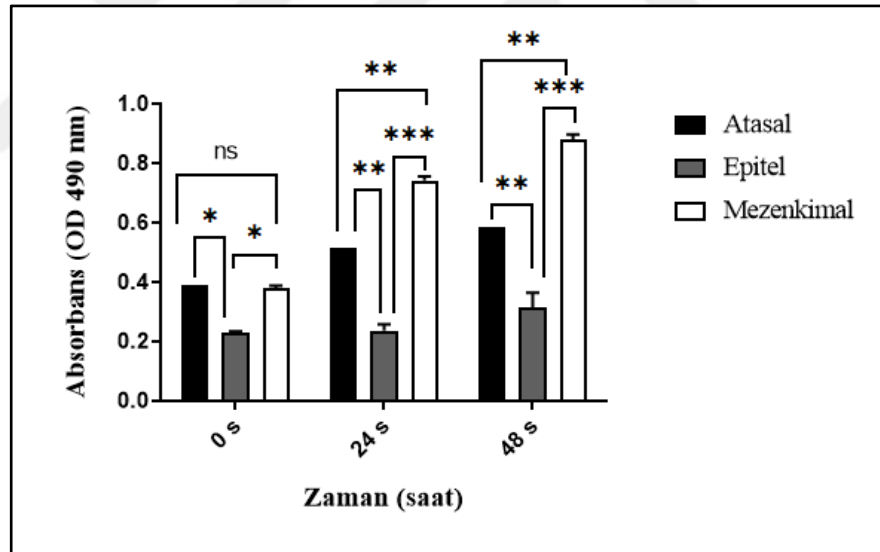
Tablo 3.1 Atasal, epitel ve mezenkimal HT-29 hücrelerinde oxaliplatin ve 5-FU IC-50 değerleri

	Oxaliplatin IC50 Değeri (μM)	5-FU IC50 Değeri (μM)
Atasal	356	307
Epitel	181	1785
Mezenkimal	377	2426

Mezenkimal grup her iki ilaca karşı epitel hücelere göre daha dirençlidir (Tablo 3.1). Ancak mezenkimal hücelerin %50'sini öldürmek için gereken 5-FU dozu, aynı miktar hücreyi öldürmek için gereken oxaliptatin miktarına göre çok daha yüksektir. Oxaliptin için IC50 değeri atasal ve mezenkimal hücelerde yakinken, 5-FU için atasal grubun en hassas grup olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Epitel gruplar ise oxaliptatine'e karşı hassasken 5-FU'e karşı oldukça dirençlidirler. Atasal grupların iki ilaç için de gösterdikleri direnç birbirine benzemektedir (Tablo 3.1).

3.6 HT-29 MET-EMT Modelinde Hücre Çoğalması

MET ve EMT geçiren HT-29 hüceleri arasında çoğalma hızı açısından bir fark olup olmadığının tespit edilmesi amacı ile 0, 24 ve 48 saat süreyle hücelerin çoğalma hızları ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 3.10'da verilmiştir.

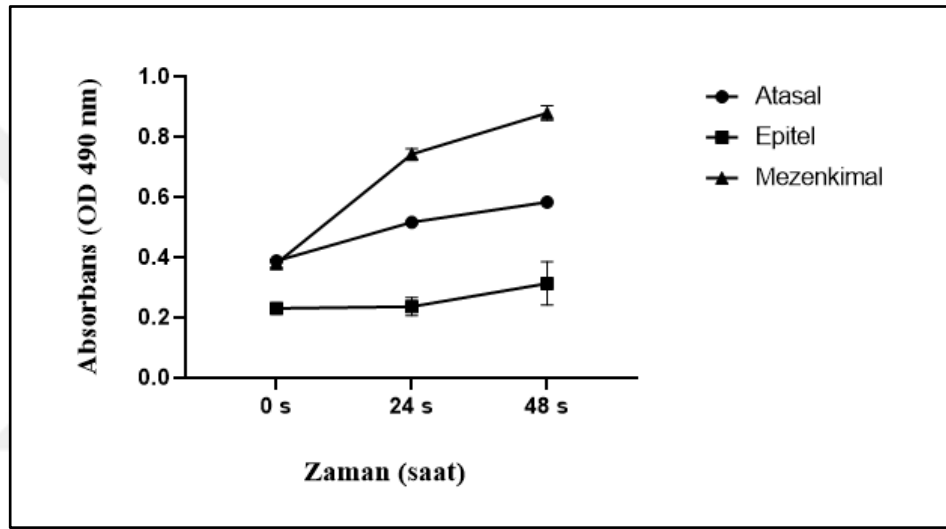


Şekil 3.10 HT-29 hücelerinde aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücelerinin çoğalma hızları CellTiter Aqueous Assay Kit (Promega) kullanılarak hesaplanmıştır. Her veri noktası n=3, ortalama±SEM. 2-way ANOVA * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001

0. saatte mezenkimal ve atasal grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ancak epitel grupla mezenkimal ve atasal grup arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.10). 0. saatte atasal ve mezenkimal grupların hücre çoğalma

hızları birbirine oldukça yakındır. 24. saate gelindiğinde bütün gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu ancak büyük farkın epitel ve mezenkimal grup arasında olduğu gözlenmiştir. Son olarak 48. saate gelindiğinde durumun 24. saatle benzer olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 3.10).

Hücre çoğalma hızlarındaki değişimlerin daha iyi gözlenebilmesi ve grupları kendi içinde karşılaştırabilmek amacı ile elde edilen sonuçlar çizgi grafiği olarak Şekil 3.11’de yeniden düzenlenmiştir.



Şekil 3.11 HT-29 hücrelerinde aHT-29, eHT-29 ve mHT-29 hücrelerinin çoğalma hızlarına ait çizgi grafiği. Her veri noktası n=3, ortalama±SEM

Gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde atasal hücrelerin ve mezenkimal hücrelerin 0. saatten 48. saate doğru hücre çoğalma hızlarının arttığı görülmektedir. Ancak epitel gruplarda önemli bir artış gözlenmemiştir.

BÖLÜM DÖRT

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada kendiliğinden farklılaşabilen kolon kanseri hücre hattı HT-29, ilk kez MET-EMT modeli olarak kullanılmıştır. Modelin öncelikle karakterizasyonu yapılmış, sonrasında temel epigenetik histon modifikasyonlarından H3K27me3/H3K4me3 miktarları ve H3K27me3 modifikasyonundan sorumlu Polycomb proteinlerinin miktarları karşılaştırılmıştır. Son olarak oluşturulan bu modelde ilaç hassasiyeti ve hücre çoğalma hızı, epitel ve mezenkimal hücre durumlarında karşılaştırılmıştır.

MET-EMT modelini oluşturmak için öncelikle optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için hücreler %80 doluluk oranına ulaştıncaya glukoz yerine Gal-besiyerine alınmış ve %100 doluluğa eriştiklerinde 0. gün olarak kabul edilmiştir. Farklılaşan ve geri farklılaşan hücreler farklı günlerde toplanmıştır. Bu hücrelerde epitel (CDX-2, E-cadherin) ve mezenkimal belirteçlerin (Transgelin) karşılaştırmaları sonucunda epitel grup olarak 20. günün ve mezenkimal grup olarak geri farklılaşma 4. gün 1:50 seyreltme oranının kullanılmasına karar verilmiştir. Böylelikle MET-EMT modeli için atasal HT-29 (aHT-29), 20. gün epitel (eHT-29) ve geri farklılaşmış mezenkimal (mHT-29) olarak üç tip hücre popülasyonu oluşturulmuştur.

Modelinin doğruluğunu göstermek amacı ile yukarıda bahsedilen üç tip hücre popülasyonu üzerinde epitel (CDX-2, E-cadherin) ve mezenkimal belirteçlerin (Transgelin, Vimentin) miktarları karşılaştırılmıştır.

Oluşturulan MET-EMT modelinde incelenen epitel belirteçlerden olan E-cadherin, epitel hücrelerde artarken mezenkimal hücrelerde azalma göstermiştir. İlk olarak Takeichi tarafından keşfedilen (Takeichi, 1977) E-cadherin, epitel hücrelerini yapışık bağlantı noktalarında birbirine bağlayan bir protein üyesidir (Wong, Fang, Chuah, Leong, ve Ngai, 2018).

E-cadherin odaklı yapılan çalışmaların bazılarında, E-cadherin ekspresyonunun kaybı, invaziv ve farklılaşmamış veya zayıf farklılaşmış karsinomlarla ilişkilendirilmiş ve E-cadherinin bir istila baskılayıcı olarak önemli bir rol oynadığı fikri ortaya konulmuştur (Frixen vd., 1991; Luo vd., 2013; Mayer vd., 1993; Oka vd., 1993; Sawada vd., 2008; Vleminckx vd., 1991). Önceki çalışmalar E-cadherin ifadesi kaybını EMT'nin ana nedeni olarak kabul etmişlerdir (Kalluri ve Weinberg, 2009). Buna karşılık yakın dönemde yapılan bazı çalışmalarda, EMT geçirmiş meme kanseri hücrelerinden kaynaklanan meme kanseri metastazlarının veya metastatik odakların, birincil tümörlere kıyasla daha farklı görüldüğü ve E-cadherin ekspresyonunun arttığı keşfedilmiştir (Chao vd., 2010,2012; Chen vd., 2015). Mevcut çalışma kapsamında, HT-29 MET-EMT modelinde E-cadherinde gözlenen değişimler literatürle doğru orantılı olarak sonuç vermiştir (Chao vd., 2010,2012; Chen vd., 2015). Diğer taraftan, E-cadherin kaybının epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) nedeni mi yoksa etkisi mi olduğu konusunda devam eden tartışmalara rağmen, E-cadherin fonksiyonel kaybı, sıklıkla hastalarda kötü prognoz ve sağkalım ile ilişkilendirilmektedir (Wong vd., 2018).

Çalışma kapsamında kullanılan bir diğer epitel belirteç ise CDX-2'dir. Oluşturulan MET-EMT modelinde CDX-2'nin epitel hücrelerde artış gösterdiği mezenkimal hücrelerde ise oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Yakın zamanda klonlanmış bir homeobox geni olan CDX-2, bağırsak epitel hücrelerinin farklılaşmasında ve proliferasyonunda iş görmesinin yanı sıra bir transkripsiyon faktörünü de kodlamaktadır (Drummond, Putt, Fox, ve Edwards, 1997). CDX-2, iyi huylu kolon epitelinde ve çoğu kolorektal adenokarsinomunda ifade edilir (Barbareschi vd., 2003; Li ve Folpe, 2004) ve bağırsak metabolizması ve farklılaşmasında yer alan birkaç genin ekspresyonunu düzenler (Mallo vd., 1997). Bir tümör baskılayıcı gen olarak varsayılan, CDX-2, kolorektal adenokarsinomların %85'inde baskılanır (Mallo vd., 1997). Mevcut çalışma kapsamında elde edilen bu sonuçlar, yukarıda verilen literatürle uyumlu olarak normal kolon dokusuna benzer özellik gösteren epitel hücrelerde CDX-2'nin miktarının arttığını göstermektedir. Bu sonuçlar CDX-2'nin tümör baskılayıcı olarak çalıştığını destekler niteliktedir.

Oluşturulan MET-EMT modelinde vimentin ifadesinin mezenkimal hücrelerde arttığı epitel hücrelerde ise azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, vimentinin normal mezenkimal hücrelerde her yerde ifade edildiği, prostat kanseri, gastrointestinal tümörler, merkezi sinir sistemi tümörleri, meme kanseri, malign melanom ve akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli epitel kanserlerde aşırı ifade edildiği bilinmektedir. Vimentinin kanserde aşırı ifade edilmesi, hızlandırılmış tümör büyümesi, invazyon ve kötü prognoz ile ilişkilidir ancak kanser ilerlemesindeki rolü belirsizliğini korumaya devam etmektedir. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda, vimentin, epitelial–mezenkimal geçiş (EMT) için bir belirteç olarak kabul edilmesine rağmen, bu süreçlere aracılık eden altta yatan olaylardaki rolü tam olarak bilinmemektedir (Satelli ve Li, 2011). Vimentin, epitel hücrelerinin şekillerini önemli ölçüde değiştirmelerine ve mezenkimal fenotip sergilemelerine neden olmaktadır (Satelli ve Li, 2011). Kanser hücrelerinde vimentinin aşırı ifade edilmesinin tümör büyümesi ve metastaz ile ilişkisi nedeniyle vimentin, kanser tedavisi için dikkat çeken bir potansiyel hedef olarak hizmet etmekle birlikte kanserdeki spesifik rolünü değerlendirmek için bu konuyla ilgili daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Satelli ve Li, 2011).

Mevcut çalışma kapsamında, HT-29 MET-EMT modelinde, transgelinin de vimentin gibi mezenkimal hücrelerde arttığı epitel hücrelerde ise azaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Diğer taraftan, atasal ve mezenkimal örneklerin protein miktarlarının birbirlerine yakın olduğu tespit edilmiştir. Mezenkimal belirteçlerden bir diğeri olan transgelin aktin bağlayıcı bir protein olup, aktin hücre iskeletinin dinamiklerini etkilemenin yanında bir metastaz başlatıcısı olarak da etki gösterebilir (Fu vd., 2000; Han vd., 2009).

Özofagus kanseri (J. Zhang vd., 2011; Qi vd., 2005), pankreas kanseri (Sitek vd., 2005; Zhou vd., 2013) gibi diğer kanser türlerinin yanında kolon kanserinde de (Lin vd., 2009; Yeo vd., 2010) kanserli dokularda azalan transgelin seviyeleri gözlenirken, artan seviyeler kötü prognoz ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Çalışma kapsamında yapılan deneyler sonucunda elde edilen sonuçlar, oluşturulan MET-EMT modelinin

yukarıda verilen literatürle uyumlu sonuçlar verdiğine ve modelin doğru çalıştığına işaret etmektedir.

MET-EMT modelinin doğruluğu ortaya konulduktan sonra dönüşümlerin plastik doğasına ışık tutmak amacıyla temel epigenetik modifikasyonlardan, H3K27me3/H3K4me3 miktarlarındaki değişimlerin yanında, H3K27me3'ün modifikasyonundan sorumlu Polycomb proteinleri, PRC2 üyesi EZH paralogları (EZH1 ve EZH2) ve PRC1 üyesi CBX paraloglarına ait (CBX-2, CBX-4, CBX-6, CBX-7 ve CBX-8) değerler belirlenmiştir.

Polycomb protein grubu (PcG'ler), önemli biyolojik süreçleri düzenleyen ve kanserde kritik rol oynayan transkripsiyonel baskılayıcı komplekslerdir. Temel Polycomb komplekslerinden PRC1 ve PRC2'yi oluşturan proteinlerinin çok sayıda paralogları bulunmakta ve kompleks oluşturulurken bu farklı paraloglar görev alabilmektedir. Adı geçen proteinlerin neden çok çeşitlilik gösterdiği ve neye bağlı olarak komplekste yer aldıkları ise henüz aydınlatılamamıştır (Schuettengruber vd., 2017).

H3K27 metillenmesi kanserde baskılayıcı görev yaparken H3K4 metillenmesi ise arttırıcı olarak iş görmektedir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, mezenkimal hücrelerde H3K27me3 miktarında bir azalışa, H3K4me3 miktarında ise bir artışa işaret ederken, epitel hücrelerde ise mezenkimal hücrelerinde ortaya çıkan durumun tam tersine bir durum tespit edilmiştir (H3K27me3 artış, H3K4me3 seviyesinde ise düşüş). Elde edilen bu sonuçlar modelle ve literatürle uyumludur. Gen baskılaması ile ilişkili bir modifikasyon olan H3K27me3, hücre farklılaşması ve çoğalması arasındaki dengeyi belirleyen genlerin ifadesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Bu histon modifikasyonunun seviyesindeki değişiklik, birçok kanser türünde tekrarlayan bir tema olarak ortaya çıkmış ve H3K27 metilasyonunun aşırı veya eksik olmasının onkojenik etkilere sahip olabileceğini göstermiştir (Ezponda ve Licht, 2014). EZH hedefi olan H3K27 metillenmesi ve bivalent promotorlarda birlikte görüldüğü H3K4 metillenmesinin, hücre plastisitesi için önemli olduğu bilinmekle birlikte işleyiş

mekanizması ile ilgili bilgiler oldukça sınırlı düzeydedir (Maruyama vd., 2011, Voigt vd., 2013).

Polycomb proteinleri PRC2 üyesi EZH paralogları (EZH1 ve EZH2) için, elde edilen sonuçlara göre; epitel özellik gösteren grupta EZH2'de bir azalma gerçekleşmiş mezenkimal özellik gösteren grupta ise epitele göre bir artış gözlenmiştir. EZH1 ise epitel hücrelerde artarken mezenkimal hücrelerde azalmıştır. EZH1 ve EZH2'nin ters orantılı olduğunu söylemek mümkündür. EZH1 ve EZH2, lizin 27'de (H3K27) histon H3'ün mono-, di- ve trimetilasyonunu katalizleyen histon metiltransferazlardır (Jain ve Di Croce, 2016). EZH2, tümör baskılayıcıların susturulmasının yanında EMT düzenleyen genler ve interferon sinyalleşmesine yol açmak suretiyle, melanom (Zingg vd., 2015), meme (Jene-Sanz vd., 2013), prostat (Genao vd., 2010), pankreas (Chen vd., 2010) ve endometriyal kanserler (Bachmann vd., 2006) dahil olmak üzere birçok farklı kanser türünde aşırı ifade edilir. Bu kanserlerin çoğunda, EZH2'nin aşırı ifadesi, yüksek proliferasyon, agresif tümörler ve neoplastik transformasyon ile ilişkilidir (Bachmann vd., 2006; Koppens ve Van Lohuizen, 2016). Oluşturulan modelde malignant kanser hücrelerine daha yakın özellik gösteren mezenkimal hücrelerde EZH2'nin epitel hücrelere göre daha fazla ifade edilmesi elde edilen sonuçların yukarıda adı geçen literatürlerle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Kolorektal kanser hücre hatlarından biri olan Caco-2 hücre hattında daha önce yapılan farklılaşma gen ifadesi profillemesi çalışmasının verilerini içeren GSE1614 (Fleet vd., 2003) mikroyarray, GEO2R (Gene Expression Omnibus, National Institute of Health) ile analiz edildiğinde farklılaşmamış ve farklılaşmış Caco-2 hücrelerinde farklı EZH ve CBX paraloglarının tercih edildiği belirlenmiştir. Buna göre farklılaşan Caco-2 hücrelerinde, EZH2 azalırken, EZH1'in arttığı görülmektedir. HT-29, kolorektal kanserde kullanılan başka bir hücre hattı olarak Caco-2 ile benzerlik göstermektedir.

EZH2'yi mutasyona uğratmak veya silmek, H3K27me3'ü artırarak veya azaltarak hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı işlevlere sahip olabilir (Jain ve Di Croce, 2016). H3K27me3'ün hücre döngüsü sırasında kendi kendine çoğaldığı ve G0 fazında

hücre döngüsü durmasıyla arttığı da gösterilmiştir (Alabert vd., 2015). Prostat kanseri hücrelerinde, EZH2'nin ifade edilmemesi genellikle hücre döngüsünün durmasına yol açar. Bu nedenle, işareti bırakan enzimlerin yokluğunda bile H3K27me3 kaybı, yayılmasının doğası gereği Polycomb bileşenlerinin dinamiklerini takip etmeyebilir (Jain ve Di Croce, 2016). EZH, Lys27 metilleyen bir enzim olup epitel hücrelerde EZH2 miktarlarının azalması ve Lys27 metillenmesindeki artış uyumlu gibi görünmemektedir. Fakat protein miktarındaki değişim her zaman enzim aktivitesiyle doğru orantılı olmayabilir bu sebeple EZH1/2'nin aktivitesi ileriki aşamalarda araştırılması gereken bir konudur. Bunun yanı sıra Lys27'yi metilleyen EZH paralogunun hangisi olduğu bilinmemektedir. EZH1'de epitel hücrelerde bir artış olduğundan yukarıda bahsedilmiştir. Dolayısıyla Lys27'yi metilleyen EZH paralogu, EZH1 olabilir.

H3K27me3 okuyucularından, PRC1 üyesi CBX paralogları CBX-2 ve CBX-6 proteini, çalışılan hücre modelinde tespit edilememiştir. CBX-7 ise epitel hücrelerde artarken mezenkimal hücrelerde azalmıştır. CBX-7 kanser alanında en çok çalışılan CBX proteindir. Çalışmanın bulgularıyla uyumlu olarak, CBX-7'nin kolon kanserinde azaldığı bilinmektedir. Bu protein hematolojik malignitelerde onkogen olarak görev yaparken, epitel temelli malignitelerde tümör baskılayıcı olarak işlev görür (Koppens ve Van Lohuizen, 2016). CBX-7, kolon kanserinde çoklu klinikopatolojik parametrelerle ilişkilidir. Normal kolon mukozası ile karşılaştırıldığında, çok sayıda kolon kanseri örneğinde CBX-7 ifadesi ya azalmakta ya da hiç bulunmamaktadır. Söz konusu olan bu durumlar kolon kanseri hastalarının kötü prognozu ile dikkate değer bir şekilde ilişkilidir (Pallante vd., 2010). Bununla birlikte CBX-7'nin transkripsiyonel düzeyde baskılanma mekanizması belirsizliğini korumaktadır. CBX-7, E-cadherin ifadesi ile pozitif yönde ilişkilidir (Federico vd., 2009; Pallante vd., 2010). CBX-7 akciğer kanserinde, siklin E ifadesinin inhibisyonu yoluyla tümör baskılayıcı bir işlev oynamaktadır (Parreno , Martinez, ve Cavalli, 2022). Literatürde verilen CBX-7 ve E-cadherin ifadesinin pozitif olarak ilişkili olma durumu oluşturulan modelde de gösterilmiştir. Epitel özellik gösteren hücrelerde hem CBX-7 miktarı hem de E-cadherin miktarı artış göstermiştir.

HT-29 MET-EMT modelinde, CBX-8'in mezenkimal özellik gösteren hücrelerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Söz konusu durum, CBX-8'in onkogen olarak görev yapabileceğini işaret etmektedir. CBX-8'in işlevleri karmaşık olup önceki çalışmalarda CBX-8'in belirli kanser türlerinde onkogen olarak işlev gördüğünü belirten sonuçlar ortaya konulmuştur (Y. Zhang vd., 2019). Örneğin, CBX-8 hepatoselüler karsinomda (HCC) (Zhang vd., 2018) ve meme kanserinde (Chung vd., 2016) tümör büyümesini ve metastazı kolaylaştırırken, kolorektal kanserde (Yang vd., 2014, 2015) tümör proliferasyonunu tetiklemesinin yanında tümör apoptozunu da engelleyebilir. Yapılan bir çalışmada CBX-8'in KRK'de ifadesinin arttığı ve p53'ü baskılayarak KRK çoğalması için gerekli olduğu, buna karşın CBX-8'in parçalanması sonucu KRK metastazını desteklediği bulunmuştur (Tang vd., 2014). CBX-8, kök hücre farklılaşmasında kritik bir rol oynar. İnsan kolon kanseri hücre hattında yapılan bir deneyde hücreler IGF1R (İnsülin benzeri büyüme faktörü-1) ile muamele edilmiş ve bu muamele sonucu hücrede CBX-8 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda hücredeki apoptoz baskılanmıştır. CBX-8'in inhibisyonu veya aşırı ekspresyonu, kolon kanseri hücrelerinin apoptoz sürecini düzenleyebilir. Bu nedenle, yapılan çalışmalar CBX-8'in kolon kanseri tedavisinde yeni bir terapötik hedef olabileceğine işaret etmektedir (Yang vd., 2015).

Epitel ve mezenkimal hücrelerde ifadelerinin birbirine zıt düzenlendiği saptanan chromobox paraloglarından CBX-7 ve CBX-8 proteinleri ileride yapılacak çalışmalar için iyi bir hedef teşkil etmektedir. Hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanma kapasiteleri ve buna bağlı olarak EMT-MET sürecinin nasıl etkilendiği araştırılması gereken bir diğer konuyu teşkil etmektedir.

Oluşturulan MET-EMT modelinde, CBX-4 epitel hücrelerde artarken mezenkimal hücrelerde azalmıştır. CBX-4, kolorektal kanserde tümör baskılayıcı olarak iş görmektedir olup hücre göçü, istilası ve metastazın engellenmesini sağlamaktadır. (Parreno vd., 2022). Diğer taraftan, CBX-4, Dnmt3b ve Jarid1b ile etkileşime girerek transkripsiyonel baskıyı artırıcı potansiyele de sahiptir (Kim vd., 2008; Zhou vd., 2009). HT-29 MET-EMT modelinde CBX-4'ün epitel hücrelerde artıp, mezenkimal

hücrelerde azalıyor oluşu, çalışmanın bulgularının bahsi geçen literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Oluşturulan MET-EMT modelinin karakterizasyonu amacı ile epitel ve mezenkimal hücrelerin, KRK'de sık kullanılan bileşiklere karşı ilaç direnci incelenmiştir. Aslında kansere bağlı ölümlerin çoğu, kanserin ilerlemesi ve kemoterapi sırasında ortaya çıkan ilaç direncinin neden olduğu kemoterapi başarısızlığından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla ilaç direnci mekanizmalarının ve bunların tersine çevrilme stratejilerinin araştırılması kanser kemoterapisinin başarısında önemli bir rol oynamaktadır (Hu vd., 2016). 5-florourasil (5-FU) direnci, kolon kanseri için geleneksel kemoterapinin başarısız olmasının başlıca nedenidir (Denise vd., 2015). Bununla birlikte, mevcut sistemik kemoterapilere yanıt oranı %50'ye ulaşabilse de, hemen hemen tüm kolon kanserli hastalarda ilaç direncinin geliştiği ve antikanser ajanların terapötik etkinliğini sınırladığı ve nihayetinde kemoterapi başarısızlığına yol açtığı bildirilmektedir (Dallas vd., 2009).

Kolorektal kanser için mevcut çeşitli tedaviler (radyasyon, cerrahi) arasında kemoterapi en uygulanabilir tedavi stratejisi olarak karşımıza çıkmaktadır (Cheng vd., 2016). Ancak, kemoterapinin normal hücrelere neden olduğu olumsuz etkiler, esas olarak kayda değer etkinliği azaltmaktadır (Morse vd., 2019). Oxaliplatin, fluorourasil ve lökovorin ile kombine edildiğinde metastatik kolorektal kanser için en etkili kemoterapiler arasında yer alan üçüncü nesil bir platin türevidir (Bensmaine vd., 2016; Giacchetti vd., 2010; de Gramont vd., 2000; Goldberg vd., 2004). Sisplatin ve karboplatin gibi diğer platin bazlı kemoterapi ajanlarıyla karşılaştırıldığında, oxaliplatin daha yüksek etkinliğe ve daha düşük toksisiteye sahiptir ve sisplatin ile çapraz direnç göstermez (Sloop vd., 2019). Kolon kanseri tedavisinde kullanılan bir diğer ilaç ise 5-FU'dur. Florourasil (FU) bazlı adjuvanın özellikle kolon kanserinin III. evresinde kemoterapinin nüksünü azalttığı ve sağkalımı sağladığı bilinmektedir (André vd., 2009).

Yapılan çalışmada hücrelere farklı dozlarda 5-FU ve oxaliplatin ilaçları uygulanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda oluşturulan üç hücre popülasyonunda da

ilaca karşı ciddi bir hassasiyet görülmemiştir. Oxaliplatin için mezenkimal hücreler genellikle daha yüksek canlılık oranına sahipken, 250 µM konsantrasyon ilaç dozunda atasal ve mezenkimal hücrelerin benzer canlılıkta olduğu fakat epitel hücrelerdeki ölümün daha yüksek oranda olduğu gözlenmiştir. Bu durum epitel hücrelerin atasal ve mezenkimal hücrelere kıyasla oxaliplatine karşı daha hassas olduğunu göstermektedir. 5-FU ilaç dozları için atasal hücrelerde canlılığın genelde daha düşük seyrettiği, mezenkimal grupta ise farklı ilaç dozlarında hücre canlılığının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. 5-FU 1000 µM ilaç dozunda epitel ve mezenkimal hücreler benzer ve atasal gruba göre daha yüksek bir canlılık oranı göstermiştir. Dolayısı ile mezenkimal hücrelerin epitel ve atasal gruplara göre 5-FU'e daha dirençli oldukları söylenebilir. Günümüzde kolon kanseri tedavisinde bu iki ilaç hastalara kombine şekilde verilmektedir. İleriki aşamalarda bu modelde iki ilacın kombine etkileri araştırılması gereken bir konudur.

Geçtiğimiz yıllarda yapılan bir çalışmada 5-FU ilacına duyarlı kolon kanseri hücre hattı ile ilaca dirençli hücre hattı karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda 5-FU'ya dirençli kolon kanseri hücreleri artan EMT ve azalmış apoptoz göstermiş ayrıca ilaca dirençli grupta epitel belirteç olan E-cadherin'in olmadığını da doğrulamıştır (Wang vd., 2020). Elde edilen sonuçlara göre oluşturulan MET-EMT modelinde mezenkimal hücreler 5-FU ilacına karşı diğer gruplardan daha fazla direnç göstermişlerdir. Ayrıca mezenkimal özellik gösteren hücrelerde E-cadherin miktarının azaldığı da gözlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen veriler bahsedilen çalışma ile doğru orantılıdır.

Son olarak atasal, epitel ve mezenkimal özellik gösteren gruplarda hücre çoğalma hızları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar epitel hücrelerin çoğalma hızlarının atasal ve mezenkimal hücrelere göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda artan hücre proliferasyonu hem oral epitel displazisi hem de oral skuamöz hücreli karsinom bir özelliği olarak tespit edilmiş ve bu nedenle malign transformasyon riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. (Jordan vd. 1998; Oliver vd. 2000; Thomson vd. 1999). Bu çalışmaya göre malign transformasyon ile hücre çoğalma hızı arasında bir ilişki bulunmaktadır. Epitel hücrelerin normal kolon hücresine benzer özellik

göstermesi mezenkimal hücrenin ise kanser hücresine benzer özellik göstermesini beklemekteyiz. Bu sebeple kanser hücrelerine benzeyen mezenkimal örneklerin çoğalma hızının normal kolon hücresine benzeyen epitel örneklerle göre daha fazla olması şaşırtıcı bir durum değildir. Dolayısıyla tümör özelliği gösteren mezenkimal hücrelerin daha proliferatif olması beklenen bir durumdur.

Ancak yapılan bir başka çalışmada epitel hücre grupları mezenkimallerden daha yüksek çoğalma gösterirken, farklı EMT alt popülasyonları arasında çoğalma hızında hiçbir fark gözlenmemiştir (Pastushenka vd., 2018). Bir başka çalışmada da yine aynı şekilde epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere göre çoğalma hızlarının çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Pastushenka ve Blanpain, 2019). Elde edilen bu sonuç oluşturulan modelde elde edilen sonuçla negatif ilişki göstermektedir. Ancak mezenkimal hücrelerin daha fazla kök hücre özelliği göstermesi, bunun sonucunda daha az bölünmeleri ve hücre çoğalma hızlarının daha düşük olması da beklenilebilen bir durumdur.

Sonuç olarak bu çalışmada kolon kanseri dahil olmak üzere pek çok kanser türünde önemli bir mekanizma olan MET-EMT sürecinin incelenmesi amacı ile literatüre yeni bir model kazandırılmış, bu süreçte meydana gelen epigenetik değişiklikler incelenmiş, ilaç hassasiyeti ve hücre çoğalma profillemesi yapılmıştır. HT-29'daki farklılaşmanın herhangi bir uyarıcı yoluyla değil kendiliğinden gerçekleşiyor olması çalışmanın özgün bir yanını oluşturmaktadır. EMT programı sıklıkla çalışılan bir program olmasına rağmen bunun tam tersi olan MET programı hakkındaki çalışmalar oldukça sınırlı düzeydedir. Bu modelde EMT programının yanı sıra MET programı da aynı genetik alt yapıya sahip hücrelerde detaylı olarak incelenebilmiştir. Çalışma, kolon kanserinde ve MET-EMT sürecinde epigenetik mekanizmaların aydınlatılması ve yeni tedavi hedeflerinin tespit edilmesi yolunda önemli bir adımı oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

- Agger, K., Christensen, J., Cloos, P. A. ve Helin, K. (2008). The emerging functions of histone demethylases. *Current Opinion in Genetics and Development*, 18(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.12.003>
- Alabert, C., Barth, T. K., Reverón-Gómez, N., Sidoli, S., Schmidt, A., Jensen, O. vd. (2015). Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes and Development*, 29(6), 585–590. <https://doi.org/10.1101/gad.256354.114>
- André, T., Bensmaine, M. A., Louvet, C., Franc, E., Lucas, V., Beerblock, O. vd. (2016). Multicenter phase II study of bimonthly high-dose leucovorin, fluorouracil infusion, and oxaliplatin for metastatic colorectal cancer resistant to the same leucovorin and fluorouracil regimen. *Journal of Clinical Oncology*, 17(11), 3560–3568.
- André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C. vd. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27(19), 3109–3116. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6771>
- Bachmann, I. M., Halvorsen, O. J., Collett, K., Stefansson, I. M., Straume, O., Haukaas, S. A. vd. (2006). EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *Journal of Clinical Oncology*, 24(2), 268–273. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.5180>
- Bai, F., Wang, C., Liu, X., Hollern, D., Liu, S., Fan, C. vd. (2022). Loss of function of BRCA1 promotes EMT in mammary tumors through activation of TGFβR2 signaling pathway. *Cell Death and Disease*, 13(3), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04646-7>

- Bakker, A., Falk, L. A., Hunt, R. D. ve King, N. W. (1985). Hypomethylation of DNA from Benign and Malignant Human Colon Neoplasms. *Science*, 228 (Nisan), 187–190.
- Barbareschi, M., Murer, B., Colby, T. V., Chilosi, M., Macri, E., Loda, M. vd. (2003). CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *American Journal of Surgical Pathology*, 27(2), 141–149. <https://doi.org/10.1097/00000478-200302000-00001>
- Bates, R. C. ve Mercurio, A. M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biology and Therapy*, 4(4), 365–370. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.4.1655>
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. vd. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, 298(5595), 1039–1043.
- Cavallaro U. ve Christofori G. (2000). Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *Journal of Neuro-Oncology*, 50(1-2), 63-70.
- Chao, Y. L., Shepard, C. R. ve Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer*, 9, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
- Chao, Y., Wu, Q., Acquafondata, M., Dhir, R. ve Wells, A. Partial (2012). Mesenchymal to epithelial reverting transition in breast and prostate cancer metastases. *Cancer Microenviron*, 5(1) 19–28. <https://doi.org/10.1007/s12307-011-0085-4>
- Chen, Y.C., Chen, Y.W., Hsu, H.S., Tseng, L.M., Huang, P., Lu, K.H. vd. (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,

385(3), 307–313.

Chen A., Wong C., Liu M., House C., Sceneay J., Bowtell D. vd. (2015). The ubiquitin ligase Siah is a novel regulator of Zeb1 in breast cancer. *Oncotarget*, 6(2), 862–873.

Chen, Y., Xie, D., Yin Li, W., Man Cheung, C., Yao, H., Chan, C. Y. vd. (2010). RNAi targeting EZH2 inhibits tumor growth and liver metastasis of pancreatic cancer in vivo. *Cancer Letters*, 297(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.05.003>

Cheng, X.J., Lin, J.C. ve Tu, S.P. (2016). Etiology and prevention of gastric cancer. *Gastrointest Tumors*, 3(1), 25-36.

Christofori, G. ve Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E- cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sciences*, 24(2), 73–76.

Chu, J. H., Yu, S., Hayward, S. W. ve Chan, F. L. (2009). Development of a three-dimensional culture model of prostatic epithelial cells and its use for the study of epithelial-mesenchymal transition and inhibition of PI3K pathway in prostate cancer. *Prostate*, 69(4), 428–442. <https://doi.org/10.1002/pros.20897>

Chung, C. Y., Sun, Z., Mullokandov, G., Bosch, A., Qadeer, Z. A., Cihan, E. vd. (2016). Cbx8 Acts Non-canonically with Wdr5 to Promote Mammary Tumorigenesis. *Cell Reports*, 16(2), 472–486. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.002>

Cooper, G.M. ve Hausman, R.E. (2009). *The cell : a molecular approach*. (5. Baskı). Oxford University Press.

Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A. ve Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase

activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111(2), 185–196.

Dallas, N. A., Xia, L., Fan, F., Gray, M. J., Gaur, P., Van Buren, G. vd. (2009). Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Research*, 69(5), 1951–1957. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2023>

De Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J. vd. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 18(16), 2938–2947. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.16.2938>

Denise, C., Paoli, P., Calvani, M., Taddei, M., Giannoni, E., Kopetz, S. vd. (2015). 5-Fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits. *Oncotarget*, 6(39), 41706–41721.

De Santa Barbara, P., Van Den Brink, G. R. ve Roberts, D. J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(7), 1322–1332. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2289-3>

Dhanak, D. ve Jackson, P. (2014). Development and classes of epigenetic drugs for cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 455(1–2), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.006>

Dobrucalı, A. (3 Şubat 2022). *Kalın bağırsak kanseri*. <https://drahmetdobrucali.com/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/>

Drummond, F., Putt, W., Fox, M. ve Edwards, Y. H. (1997). Cloning and chromosome assignment of the human CDX2 gene. *Annals of Human Genetics*, 61(5), 393–400. <https://doi.org/10.1017/S0003480097006465>

- Eissenberg, J. C. ve Shilatifard, A. (2010). Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Developmental Biology*, 339(2), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.017>
- Ezponda, T. ve Licht, J. D. (2014). Molecular pathways: Deregulation of histone H3 lysine 27 methylation in cancer - Different paths, same destination. *Clinical Cancer Research*, 20(19), 5001–5008. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2499>
- Federico, A., Pallante, P., Bianco, M., Ferraro, A., Esposito, F., Monti, M. vd. (2009). Chromobox protein homologue 7 protein, with decreased expression in human carcinomas, positively regulates E-cadherin expression by interacting with the histone deacetylase 2 protein. *Cancer Research*, 69, 7079–7087.
- Feinberg, A. P. ve Vogelstein, B. (1987). Alterations in DNA methylation in human colon neoplasia. *Seminars in Surgical Oncology*, 3(3), 149–151. <https://doi.org/10.1002/ssu.2980030304>
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D. ve Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Development*, 17(15), 1870–1881.
- Fitzgerald, R. C., Omary, M. B. ve Triadafilopoulos, G. (1997). Acid modulation of HT29 cell growth and differentiation. An in vitro model for Barrett's esophagus. *Journal of Cell Science*, 110(5), 663–671. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.5.663>
- Fleet, J. C., Wang, L., Vitek, O., Craig, B. A. ve Edenberg, H. J. (2003). Gene expression profiling of Caco-2 BBe cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation. *Physiol Genomics*, 13 (1), 57-68.
- Francis, N. J., Kingston, R. E. ve Woodcock, C. L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574-1577.

- Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A. vd. (1991). E-cadherin mediated cell–cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology*, 113, 173–185.
- Fu, Y., Liu, H. W., Forsythe, S. M., Kogut, P., McConville, J. F., Halayko, A. J. vd. (2000). Mutagenesis analysis of human SM22: Characterization of actin binding. *Journal of Applied Physiology*, 89(5), 1985–1990. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.5.1985>
- Gehart, H. ve Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>
- Genao, I., Hendrickson, K., Diers, D., Browne, R. ve Rawlings, J. E. (2010). Creating a medical home through the 340B Drug pricing program. *Connecticut Medicine*, 74(10), 615–620. <https://doi.org/10.1038/nature01042.1>
- Giacchetti, B. S., Perpoint, B., Zidani, R., Bail, N. Le, Faggiuolo, R. vd. (2010). Added to Chronomodulated Fluorouracil – Leucovorin as First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer*, 18(1), 136–147.
- Goldberg, R. M., Sargent, D. J., Morton, R. F., Fuchs, C. S., Ramanathan, R. K., Williamson, S. K. vd. (2004). A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 22(1), 23–30. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.09.046>
- Grady, W. M. ve Carethers, J. M. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.076>

- Greenburg, G. ve Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology*, 95(1), 333–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>
- Gutierrez, L., Oktaba, K., Scheuermann, J. C., Gambetta, M. C., Ly-Hartig, N. ve Müller, J. (2012). The role of the histone H2A ubiquitinase Sce in Polycomb repression. *Development*, 139, 117-127.
- Haberkorn, U. (2007). What is cancer? *Advances in Nuclear Oncology*, 62(4), 1–16. <https://doi.org/10.3109/9781420091380-2>
- Hahn, M. A., Li, A. X., Wu, X., Yang, R., Drew, D. A., Rosenberg, D. W. vd. (2014). Loss of the polycomb mark from bivalent promoters leads to activation of cancer-promoting genes in colorectal tumors. *Cancer Research*, 74(13), 3617–3629. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3147>
- Han, M., Dong, L. H., Zheng, B., Shi, J. H., Wen, J. K. ve Cheng, Y. (2009). Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life Sciences*, 84(13–14), 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.11.017>
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. (2011). *Cell*, 44(5), 646-674.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1) 57-70.
- Helander, H. F. ve Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract-revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 49(6), 681–689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Herman, J. G. ve Baylin, S. B. (2003). Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042–

2054. <https://doi.org/10.1056/nejmra023075>

Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y. ve Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 22(30), 6876–6889. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6876>

Ilantzis, C., Demarte, L., Screaton, R.A. ve Stanners, C.P. (2002). Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia*, 4(2), 151-163.

Jain, P. ve Di Croce, L. (2016). Mutations and deletions of PRC2 in prostate cancer. *BioEssays*, 38(5), 446–454. <https://doi.org/10.1002/bies.201500162>

Jene-Sanz, A., Váraljai, R., Vilkova, A. V., Khramtsova, G. F., Khramtsov, A. I., Olopade, O. I. vd. (2013). Expression of Polycomb Targets Predicts Breast Cancer Prognosis. *Molecular and Cellular Biology*, 33(19), 3951–3961. <https://doi.org/10.1128/mcb.00426-13>

Johnson, J. P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, 18(3), 345-357.

Jordan ,R.C.K., Bradley, G. ve Slingerland, J. (1998). Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. *The American Journal of Pathology*, 152(2), 585–590.

Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F. ve Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 111–130. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0230-y>

Jung, H., Lee, K. P., Park, S. J., Park, J. H., Jang, Y. S., Choi, S. Y. vd. (2008).

- TMPRSS4 promotes invasion, migration and metastasis of human tumor cells by facilitating an epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 27(18), 2635–2647. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210914>
- Justin, N., De Marco, V., Aasland, R. ve Gambelin, S. J. (2010). Reading, writing and editing methylated lysines on histone tails: New insights from recent structural studies. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6), 730–738. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.012>
- Kalluri, R. ve Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428.
- Katti, A., Diaz, B. J., Caragine, C. M., Sanjana, N. E. ve Dow, L. E. (2022). CRISPR in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13, 259-279. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00441-w>
- Kim, S.H., Park, J., Choi, M.C., Park, J.H., Kim, H.P., Lee, J.H. vd. (2008). DNA methyltransferase 3B acts as a co-repressor of the human polycomb protein hPc2 to repress fibroblast growth factor receptor 3 transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(11), 2462-2471.
- Klauke, K., Radulović, V., Broekhuis, M., Weersing, E., Zwart, E., Olthof, S. vd. (2013). Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Nature Cell Biology*, 15(4), 353–362. <https://doi.org/10.1038/ncb2701>
- Klymkowsky, M. W. ve Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: A cancer researcher's conceptual friend and foe. *American Journal of Pathology*, 174(5), 1588–1593. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>
- Kondo, Y., Shen, L., Cheng, A. S., Ahmed, S., Bumber, Y., Charo, C. vd. (2008). Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of

- promoter DNA methylation. *Nature Genetics*, 40(6), 741–750.
<https://doi.org/10.1038/ng.159>
- Koppens, M. ve Van Lohuizen, M. (2016). Context-dependent actions of Polycomb repressors in cancer. *Oncogene*, 35(11), 1341–1352.
<https://doi.org/10.1038/onc.2015.195>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G. vd. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–25.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. ve Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Development*, 16(22), 2893–2905.
- Küçükkaraduman, B. (2021) *Multimomics approaches to overcome drug resistance in cancer* [Doktora Tezi]. Bilkent Üniversitesi.
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S. vd. (2010). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), 106–133.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.010>
- Lacroix, B., Keding, M., Simonassmann, P., Rousset, M., Zweibaum, A. ve Haffen, K. (1984). Developmental pattern of brush-border enzymes in the human-fetal colon - correlation with some morphogenetic events. *Early Human Development*, 9(2), 95-103.
- Lao, V. V. ve Grady, W. M. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(12), 686–700.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>

- Li, M. K. ve Folpe, A. L. (2004). CDX-2, a new marker for adenocarcinoma of gastrointestinal origin. *Advances in Anatomic Pathology*, 11(2), 101–105. <https://doi.org/10.1097/00125480-200403000-00004>
- Li, Q., Chen, C., Kapadia, A., Zhou, Q., Harper, M. K., Schaack, J. vd. (2011). 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: High-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. *Journal of Biomolecular Screening*, 16(2), 141–154. <https://doi.org/10.1177/1087057110392995>
- Lin, Y., Buckhaults, P. J., Lee, J. R., Xiong, H., Farrell, C., Podolsky, R. H. vd. (2009). Association of the actin-binding protein transgelin with lymph node metastasis in human colorectal cancer. *Neoplasia*, 11(9), 864–873. <https://doi.org/10.1593/neo.09542>
- Liu, Q., Guo, L., Lou, Z., Xiang, X. ve Shao, J. (2022). Super-enhancers and novel therapeutic targets in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, 13(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04673-4>
- Luo, M., Li, Z., Wang, W., Zeng, Y., Liu, Z. ve Qiu, J. (2013). Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett*, 333(2), 213–221.
- Mallo, G. V., Rechreche, H., Frigerio, J. M., Rocha, D., Zweibaum, A., Lacasa, M. vd. (1997). Molecular cloning, sequencing and expression in the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 74(1), 35–44. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970220\)](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970220)74(1)<35::AID-IJC7400351[1.0.TD;2-#]>3.0.CO;2-1)
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y vd. (2008). The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–715.

- Maruyama, R., Choudhury, S., Kowalczyk, A., Bessarabova, M., Beresford-Smith B., Conway, T. vd. (2011). Epigenetic regulation of cell type-specific expression patterns in the human mammary epithelium. *PLoS Genet*, 7(4).
- Mayer, B., Johnson, J.P., Leidl, F., Jauch, K.W., Heiss, M.M., Schildberg, F.W. vd. (1993). E-Cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Research*, 53(7), 1690–1695.
- Mikami, Y., Matsuzaki, H., Takeshima, H., Makita, K., Yamauchi, Y. ve Nagase, T. (2016). Development of an in vitro assay to evaluate contractile function of mesenchymal cells that underwent epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(112), 1–11. <https://doi.org/10.3791/53974>
- Miller, T., Krogan, N. J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M. vd. (2001). COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 12902-12907.
- Min, J., Zhang, Y. ve Xu, R. M. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Development*, 17(15), 1823- 1828.
- Mjaatvedt, C.H. ve Markwald, R.R. (1989). Induction of an epithelial- mesenchymal transition by an in vivo adheron-like complex. *Developmental Biology*, 136(1), 118-128.
- Morse, M.A., Hochster, H. ve Benson, A. (2019). Perspectives on treatment of metastatic colorectal cancer with immune checkpoint inhibitor therapy. *The Oncologist*, 25(1), 33-45.

- Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B. vd. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell*, 111(2), 197–208.
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T. vd. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Research*, 53(7), 1696–1701.
- Oliver, R.J., MacDonald, D.G. ve Felix, D.H. (2000) Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. *Journal of Oral Pathology Medicine*, 29(2), 49–55.
- Özçelik, B. (2018) *The role of glutathione-s-transferase in epithelial mesenchymal transition (emt) model in colorectal cancer and the enhancement of adjuvant therapy by targeting glutathione-s-transferase inhibitor* [Doktora Tezi]. Hacettepe Üniversitesi.
- Pallante, P., Terracciano, L., Carafa, V., Schneider, S., Zlobec, I., Lugli, A. vd. (2010). The loss of the CBX7 gene expression represents an adverse prognostic marker for survival of colon carcinoma patients. *European Journal of Cancer*, 46(12), 2304–2313.
- Pang, R., Law, W.L., Chu, A.C.Y., Poon, J.T., Lam, C.S.C., Chow, A.K.M. vd. (2010). A subpopulation of CD26⁺ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell*, 6, 603–615.
- Parreno, V., Martinez, A. M. ve Cavalli, G. (2022). Mechanisms of Polycomb group protein function in cancer. *Cell Research*, 32(3), 231–253. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00606-6>
- Pastushenko, I. ve Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 29(3), 212–226.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>

- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S. vd. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>
- Pattabiraman, D. R., Bierie, B., Kober, K. I., Thiru, P., Krall, J. A., Zill, C. vd. (2016). Activation of PKA leads to mesenchymal-to-epithelial transition and loss of tumor-initiating ability. *Science*, 351(6277). <https://doi.org/10.1126/science.aad3680>
- Pignatelli, M., Liu, D., Nasim, M.M., Stamp, G.W., Hirano, S. ve Takeichi, M. (1992). Morphoregulatory activities of e-cadherin and beta-1 integrins in colorectal tumor-cells. *British Journal of Cancer*, 66(4), 629-634.
- Pinto, M., Appay, M. D., Simon-Assmann, P., Chevalier, G., Dracopoli, N., Fogh, J. vd. (1982). Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Cell Growth Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association For Cancer Research*, 44(2), 193-196.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Keinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E. vd. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco - 2 in culture. *Cell Growth Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association For Cancer Research*, 47, 323–30.
- Piunti, A. ve Shilatifard, A. (2016). Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families. *Science*, 352(6290).
- Polyak, K. ve Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 265–273. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- Qi, Y., Chiu, J. F., Wang, L., Kwong, D. L. W. ve He, Q. Y. (2005). Comparative

- proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics*, 5(11), 2960–2971. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401175>
- Ribatti, D., Tamma, R. ve Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology*, 13(6), 100773. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>
- Rosivatz, E., Becker, I., Bamba, M., Schott, C., Diebold, J., Mayr, D. vd. (2004). Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *International Journal of Cancer*, 111(5), 711–719. <https://doi.org/10.1002/ijc.20317>
- Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. ve David Allis, C. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(12), 983–994. <https://doi.org/10.1038/nrm2298>
- Sade Memişoğlu, A. (2014) *Investigation of the molecular pathways involved in intestinal epithelial differentiation* [Doktora Tezi]. Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- Satelli, A. ve Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033–3046. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>
- Sawada, K., Mitra, A. K., Radjabi, A. R., Bhaskar, V., Kistner, E. O., Tretiakova, M. vd. (2008). Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via $\alpha 5$ -integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Research*, 68(7), 2329–2339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5167>
- Schuettengruber, B., Bourbon, H. M., Di Croce, L. ve Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*, 171(1), 34–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>
- Scoazec, J. Y. (2009). Transition épithélio-mésenchymateuse et cancer du côlon.

Annales de Pathologie, 29(5), 63–64. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2009.07.037>

Shibue, T. ve Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>

Shilatifard, A. (2008). Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(3), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.019>

Simon, J.A. ve Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Molecular Cell Biology*, 10(10), 697-708.

Simon-Assman, P., Turck, N., Sidhoum-Jenny, M., Gradwohl, G. ve Kedinger, M. (2007). In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation: *Cell Biology and Toxicology*, 23(4), 241-256.

Sitek, B., Lüttges, J., Marcus, K., Klöppel, G., Schmiegell, W., Meyer, H. E. vd. (2005). Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics*, 5(10), 2665–2679. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401298>

Sloop, J.T., Carter, J.A., Bierbach, U., Jones, B.T. ve Donati, G.L. (2019). Effects of platinumbased anticancer drugs on the trace element profile of liver and kidney tissue from mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 62–68.

Solanas, G., M. Porta-de-la-Riva, C. Agusti, D. Casagolda, F. Sanchez-Aguilera, M. J. Larriba, F. vd. (2008). E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappa B transcriptional activity in mesenchymal gene expression. *Journal of Cell Science*, 121, 2224-2234.

Sparmann, A. ve Van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate,

- development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), 846–856.
<https://doi.org/10.1038/nrc1991>
- Stock, J. K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H. vd. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nature Cell Biol*, 9(12), 1428–1435.
- Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *The Journal of Cell Biology*, 75, 464–474.
- Tam, W. L. ve Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), 1438–1449.
<https://doi.org/10.1038/nm.3336>
- Tang, J., Wang, G., Zhang, M., Li, F. Y., Sang, Y., Wang, B. vd. (2014). Paradoxical role of CBX8 in proliferation and metastasis of colorectal cancer. *Oncotarget*, 5(21), 10778–10790. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2502>
- Thiery, J. P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 740–746.
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.006>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. ve Nieto, M. A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thompson, E.W., Torri, J., Sabol, M., Sommers, C.L., Byers, S., Valverius, E.M., vd. 1994. Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 12(3), 181–194.
- Thomson, P.J., Potten, C.S. ve Appleton, D.R. (1999) Characterisation of epithelial cell activity in patients with oral cancer. *The British Journal of Oral Maxillofacial*

Surgery, 37(5), 3843–3849.

Türk, S., Baysal, I. ve Uçar, G. (2019). Glutathione S-transferase- π levels of in vitro generated epithelial mesenchymal transition model in caco-2 cell line. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 39(1), 10–16.

Van Engeland, M., Derks, S., Smits, K. M., Meijer, G. A. ve Herman, J. G. (2011). Colorectal cancer epigenetics: Complex simplicity. *Journal of Clinical Oncology*, 29(10), 1382–1391. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.2319>

Vissers, J. H. A., Van Lohuizen, M. ve Citterio, E. (2012). The emerging role of Polycomb repressors in the response to DNA damage. *Journal of Cell Science*, 125(17), 3939–3948. <https://doi.org/10.1242/jcs.107375>

Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W. ve van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66(1), 107–119.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S., Preisinger, A.C., Leppert, M. vd. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The new England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532.

Voigt, P., Tee, W.W. ve Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes Development*, 27(12), 1318–1338.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. vd. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 431(7010), 873-878.

Wang, Y., Kuang, H., Xue, J., Liao, L., Yin, F. ve Zhou, X. (2017). LncRNA AB073614 regulates proliferation and metastasis of colorectal cancer cells via the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 1230–1237.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.024>

Wang, B., Ma, N., Zheng, X., Li, X., Ma, X., Hu, J. vd. (2020). GDF15 Repression Contributes to 5-Fluorouracil Resistance in Human Colon Cancer by Regulating Epithelial-Mesenchymal Transition and Apoptosis. *BioMed Research International*, <https://doi.org/10.1155/2020/2826010>

Weinberg, R.A. (2014). *The biology of cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group.

Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O. ve Ngai, S.C. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 121(Ekim 2017), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010>

Wood, L. D., Parsons, D. W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R. J. vd. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318(5853), 1108–1113. <https://doi.org/10.1126/science.1145720>

Wu, R., Wang, L., Yin, R., Hudlikar, R., Li, S., Kuo, H. C. D. vd. (2020). Epigenetics/epigenomics and prevention by curcumin of early stages of inflammatory-driven colon cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 59(2), 227–236. <https://doi.org/10.1002/mc.23146>

Yang, S., Liu, W., Li, M., Wen, J., Zhu, M. ve Xu, S. (2015). Insulin-Like Growth Factor-1 Modulates Polycomb Cbx8 Expression and Inhibits Colon Cancer Cell Apoptosis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71(3), 1503–1507. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0373-y>

Yeo, M., Park, H. J., Kim, D. K., Kim, Y. B., Cheong, J. Y., Lee, K. J. vd. (2010). Loss of SM22 is a characteristic signature of colon carcinogenesis and its restoration suppresses colon tumorigenicity in vivo and in vitro. *Cancer*, 116(11),

2581–2589. <https://doi.org/10.1002/cncr.25003>

Yi, J. M., Dhir, M., Guzzetta, A. A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Heo, K., Yang, K. M. vd. (2012). DNA methylation biomarker candidates for early detection of colon cancer. *Tumor Biology*, 33(2), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0302-2>

Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3), 497-503.

Zeisberg, M. ve Neilson, E. G. (2009). Personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1429–1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>.protected

Zhang, C. Z., Chen, S. L., Wang, C. H., He, Y. F., Yang, X., Xie, D. vd. (2018). CBX8 exhibits oncogenic activity via AKT/ b-catenin activation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 78(1), 51–63. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0700>

Zhang, J., Wang, K., Zhang, J., Liu, S. S., Dai, L. ve Zhang, J.Y. (2011). Using proteomic approach to identify tumor-associated proteins as biomarkers in human esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Proteome Research*, 10(6), 2863–2872. <https://doi.org/10.1021/pr200141c>

Zhang, Y., Kang, M., Zhang, B., Meng, F., Song, J., Kaneko, H. vd. (2019). M6A modification-mediated CBX8 induction regulates stemness and chemosensitivity of colon cancer via upregulation of LGR5. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1116-x>

Zhou, L., Zhang, R., Zhang, L., Sun, Y., Yao, W., Zhao, A. vd. (2013). Upregulation of transgelin is an independent factor predictive of poor prognosis in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Science*, 104(4), 423–430. <https://doi.org/10.1111/cas.12107>

- Zhou, W., Chen, H. ve Zhang, L. (2009). The PcG protein hPc2 interacts with the N-terminus of histone demethylase JARID1B and acts as a transcriptional co-repressor. *BMB Reports*, 42(3), 154–159.
- Zhu, Q. C., Gao, R. Y., Wu, W. ve Qin, H. L. (2013). Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(5), 2689–2698. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.5.2689>
- Zingg, D., Debbache, J., Schaefer, S. M., Tuncer, E., Frommel, S. C., Cheng, P. vd. (2015). The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. *Nature Communications*, 6(Mayıs 2014), 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms7051>
- Zoetemelk, M., Rausch, M., Colin, D. J., Dormond, O. ve Nowak-Sliwinska, P. (2019). Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42836-0>
- Zweibaum, A., M. Pinto, G. Chevalier, E. Dussaux, N. Triadou, B. Lacroix, K. vd. (1985). Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human-colon tumor-cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of Cellular Physiology*, 122(1), 21-29.